

Laccasen und Laccasegene des acidophilen Ascomyceten

Hortaea acidophila

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Larissa Tetsch

aus

Kiel

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Erwin A. Galinski

2. Referent: Prof. Milan Höfer

Tag der Promotion: 09.12.2005

„Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert“

Erscheinungsjahr: 2005

Für Pascal

„Das Glück verlässt uns nie, es verweist nur von Zeit zu Zeit“

Verfasser unbekannt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Hortaea acidophila</i> , ein neu beschriebener acidophiler Ascomycet	1
1.1.1	Systematische Einordnung von <i>H. acidophila</i>	2
1.1.2	Definition und Bedeutung von „schwarzen Hefen“	3
1.2	Eigenschaften, Vorkommen und Funktion von Melanin	3
1.2.1	Melanin in Pilzen	4
1.3	Eigenschaften von Laccasen	6
1.3.1	Funktionen und Oxidationsmechanismus der Laccasen	7
1.3.2	Industrielle Anwendungen von Laccasen	8
1.3.3	Laccasen aus Basidiomyceten	9
1.3.4	Laccasen aus Ascomyceten	11
1.3.5	Laccasen aus melanisierten Pilzen	12
1.4	Ziel der vorliegenden Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Verwendete Mikroorganismen	15
2.2	Verwendete Plasmide	16
2.3	Nährmedien	17
2.4	Puffer und Lösungen	19
2.5	Kultivierungsverfahren	21
2.5.1	Stammhaltung und Anzucht von Pilzen	21
2.5.2	Stammhaltung und Anzucht von Bakterien	21
2.5.3	Wachstumsversuche mit <i>H. acidophila</i>	22
2.5.4	Herstellung von Glycerinkulturen	22
2.6	Aktivitätsbestimmung der Laccase	22
2.6.1	Fotometrische Aktivitätsbestimmung mit ABTS	23
2.6.2	Berechnung der Enzymaktivität	23
2.6.3	Proteinbestimmung	24
2.6.4	Trockengewichtsbestimmung	24
2.7	Immunologischer Nachweis der Laccase	24
2.7.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	25
2.7.2	Western Blot	27
2.7.3	Immunologische Hybridisierung und kolorimetrische Detektion	28

2.8	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	28
2.8.1	Isolierung von genomischer DNA aus Pilzen	28
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	31
2.8.3	Isolierung von RNA	31
2.8.3.1	Isolierung von mRNA mittels Dynabeads ®	31
2.8.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA	32
2.8.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.9	Enzymatische Modifikationen von DNA	35
2.9.1	Restriktionsspaltung und Dephosphorylierung	35
2.9.2	Ligation	36
2.9.3	DNA-Konzentrierung und DNA-Aufreinigung	36
2.10	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.10.1	Gelelektrophorese von DNA	37
2.10.2	Gewinnung von DNA aus Agarosegelen	37
2.10.3	Gelelektrophorese von RNA	38
2.11	Transformation von Bakterien	38
2.11.1	Herstellung von superkompetenten Zellen	39
2.11.2	Überprüfung der Transformationseffizienz	40
2.11.3	Transformation von superkompetenten Bakterien	40
2.12	Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
2.12.1	Verwendete Primer	41
2.12.2	Standard-PCR	45
2.12.3	RT-PCR zur Synthese von cDNA	47
2.12.4	Inverse PCR	48
2.12.4.1	Wahl von Restriktionsenzymen und Primern	48
2.12.4.2	Vorbereitung der Proben für die PCR	50
2.12.4.3	PCR mit inversen Primern	52
2.13	Southern Blot	54
2.13.1	Gelelektrophorese und Kapillarblot	54
2.13.2	Hybridisierung	54
2.13.3	Kolorimetrische Detektion	55
2.14	Herstellung einer genomischen DNA-Bank	55
2.14.1	Vorbereitung der Eluate	56
2.14.2	Vorbereitung des Vektors	56

2.14.3	Ligation und Transformation	57
2.14.4	Durchmusterung der Bank mittels Filterhybridisierung und PCR ..	58
2.15	DNA-Sequenzierung	59
2.16	Sequenzanalysen	60
2.16.1	DNA-Sequenzanalyse	61
2.16.2	Protein-Sequenzanalyse	61
2.16.3	Hinterlegung der Sequenzinformation	61
2.17	Chemikalien, Materialien, Computerprogramme	61
3	Ergebnisse	66
3.1	Nachweis einer Laccase von <i>Hortaea acidophila</i>	66
3.1.1	Nachweis einer Oxidase im Plattentest	66
3.1.2	Beteiligung der Oxidase an der Melaninsynthese	66
3.1.3	Lokalisation der Oxidase	69
3.1.4	Kupferabhängigkeit der Oxidase	69
3.1.5	Substratspektrum der Oxidase	70
3.1.6	Nachweis über laccasespezifische Antikörper	71
3.2	Nachweis der Laccasegene von <i>H. acidophila</i>	72
3.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren aus <i>H. acidophila</i>	72
3.2.2	Herkunft der cbs-Primer	75
3.2.3	Amplifikation laccasespezifischer Genfragmente	77
3.2.4	Isolierung der amplifizierten Laccasegenfragmente	85
3.2.5	Sequenzanalyse der Laccasegenfragmente	85
3.2.5.1	Sequenzen der Laccasegenfragmente	85
3.2.5.2	Homologien der abgeleiteten Laccasefragmente	87
3.2.6	Überprüfung der Existenz mehrerer Laccasegene durch „Nested PCR“	91
3.3	Isolierung der vollständigen Laccasegene	94
3.3.1	Auswahl von Restriktionsenzymen und Sonden für die Isolierung der Laccasegene	94
3.3.1.1	Synthese der digoxigeninmarkierten Sonden	94
3.3.1.2	Southern Blot Analyse	95
3.3.2	Isolierung vollständiger Laccasegene über die Herstellung von Genbanken	97

3.3.2.1	Herstellung von Laccasegen tragenden Restriktions- fragmenten	97
3.3.2.2	Herstellung der DNA-Banken	98
3.3.2.3	Durchmusterung der Genbanken	99
3.3.3	Isolierung vollständiger Laccasegene über inverse PCR	104
3.3.3.1	Etablierung der Methode	104
3.3.3.2	Inverse PCR zur Isolierung von <i>lacc1</i> (cbs2/3)	106
3.3.3.3	Inverse PCR zur Isolierung von <i>lacc2</i> (cbs2/int)	110
3.3.3.4	Inverse PCR zur Isolierung von <i>lacc3</i> (int/cbs3)	112
3.3.3.5	Inverse PCR zur Isolierung von <i>lacc4</i> (cbs1/2)	113
3.3.3.6	Sequenzierstrategie für die Laccasegene	114
3.4	Sequenzanalyse der Laccasegene und der von ihnen kodierten hypothetischen Proteine	115
3.4.1	Eigenschaften der Laccasegensequenzen	115
3.4.2	Annotierte Gensequenzen	119
3.4.2.1	Annotierte Sequenz des Gens <i>lacc1</i>	119
3.4.2.2	Annotierte Sequenz des Gens <i>lacc2</i>	124
3.4.2.3	Annotierte Sequenz des Gens <i>lacc3</i>	129
3.4.2.4	Annotierte Sequenz des Gens <i>lacc4</i>	131
3.4.3	Eigenschaften der Laccasesequenzen	132
3.4.3.1	Anwesenheit von Signalsequenzen für den Proteinexport	133
3.4.3.2	Hydrophobizitätsprofile	135
3.4.3.3	Aminosäurezusammensetzung und Anpassung an saure Umweltbedingungen	137
3.4.3.4	Redoxpotenzial	140
3.4.4	Sequenzvergleiche und Homologien der hypothetischen Laccasen	140
4	Diskussion	146
4.1	Nachweis einer Laccase von <i>H. acidophila</i>	146
4.1.1	Extrazelluläre Lokalisation der Oxidase	146
4.1.2	Kupferabhängigkeit der Oxidase	148
4.1.3	Substratspezifität der Oxidase	149
4.1.4	Existenz von Laccasen in <i>H. acidophila</i>	150
4.1.5	Beteiligung der Oxidase an der Melaninsynthese	151

4.2	Nachweis der Laccasegene von <i>H. acidophila</i>	153
4.2.1	Extraktion von Nukleinsäuren	153
4.2.2	PCR mit laccasespezifischen Primern	154
4.2.3	Vergleich der verwendeten Primer mit den Laccasegenesequenzen von <i>H. acidophila</i>	156
4.3	Isolierung der vollständigen Laccasegene	159
4.3.1	Herstellung und Durchmusterung von Genbanken	160
4.3.2	Amplifikation der Laccasegene mittels inverser PCR	163
4.4	Sequenzanalyse der Laccasegene und der hypothetischen Laccasen	166
4.4.1	Eigenschaften der Laccasegene	166
4.4.2	Eigenschaften der hypothetischen Laccasen	175
4.4.3	Homologien und Verwandtschaftsverhältnisse	179
4.4.4	Anpassungen der Laccasen an niedrige pH-Werte	184
4.5	Potenzieller Nutzen der Laccasen	188
4.6	Ausblick	189
5	Zusammenfassung	192
6	Literatur	194
7	Anhang	207
7.1	Abkürzungsliste	207
7.1.1	Allgemeine Abkürzungen	207
7.1.2	Abkürzungen für PCR-Produkte und Restriktionsfragmente	209
7.1.3	Abkürzungen für Sequenzen	211
7.1.4	Nomenklatur der Laccasegene und Laccasen	211
7.2	Danksagung	212
7.3	Lebenslauf	214
7.4	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	215
	Erklärung	217

1 Einleitung

Die Biotechnologie nutzt Mikroorganismen und ihre Stoffwechselleistungen, um Naturstoffe und sogar vollkommen neuartige Werkstoffe kostengünstig und schonend herzustellen. Da die bisher untersuchten Mikroorganismen nicht in der Lage sind, jede beliebige Reaktion durchzuführen, ist es sinnvoll, nach neuen Organismen zu suchen, die noch unbekannte Stoffwechselwege nutzen oder deren Enzyme an bestimmte Umweltbedingungen optimal angepasst sind. Nachdem Bakterien schon längere Zeit biotechnologisch genutzt werden, da sie physiologisch vielseitig und zudem oft leicht zu kultivieren und genetisch zu manipulieren sind, wird das Potenzial der Pilze erst langsam erkannt. Von den geschätzten 1,5 Millionen Arten sind erst 70.000 bekannt, und selbst diese sind meist unzureichend beschrieben (Prillinger *et al.*, 2002). Diese Vielzahl an unbekannten Pilzen hält ein großes Potenzial an Stoffwechselleistungen bereit, darunter vor allem in den Bereichen des biologischen Abbaus, der Lebensmittelindustrie und der Modifikation und Synthese von Naturstoffen.

1.1 *Hortaea acidophila*, ein neu beschriebener acidophiler Ascomycet

Der Pilz *Hortaea acidophila* wurde erst kürzlich isoliert (2000) und wissenschaftlich beschrieben (Hölker *et al.*, 2004). Bei dem zur Isolierung verwendeten Anreicherungsmedium handelte es sich um einen wässrigen Extrakt aus Braunkohle mit einem pH-Wert von 0,6. Als einzige Kohlenstoffquelle konnte der Pilz suspendierte Humin- und Fulvinsäuren nutzen. Nach zwei Monaten bildeten sich auf dem Medium schwarze Kolonien. Die Fähigkeit des Wachstums unter extrem sauren Bedingungen machte den Organismus interessant für weitere Untersuchungen. *H. acidophila* zeigte ein Wachstum in einem weiten pH-Bereich zwischen pH 1 und pH 9, wobei dieses im optimalen Bereich von pH 2-6 überwiegend einzellig, jenseits davon meist filamentös stattfand (Abb.1). Das Wachstumsoptimum lag auf Komplexmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle bei pH 3 und einer Temperatur um 22 °C. Ab 30 °C war kein Wachstum mehr zu verzeichnen. Salzkonzentrationen von bis zu 5 % NaCl wurden toleriert.

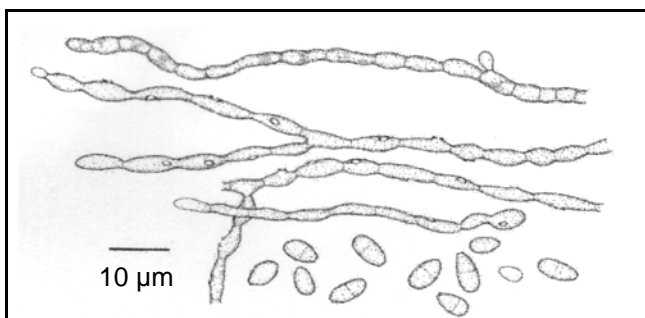


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme von *H. acidophila*. Es kann ein einzelliges und ein filamentöses Wachstumsstadium unterschieden werden. Die Einzelzellen sind 5-10 µm lang (aus Hölker *et al.* 2004).

Ein zweites auffallendes Charakteristikum des Pilzes neben seiner offensichtlichen Acidophilie war eine Schwarzfärbung der Kolonien, die auf die Fähigkeit zur Melaninbildung hinwies. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine verdickte, osmiophile Zellwand, deren Einlagerungen vermutlich Melanin darstellen (Abb. 2). Bei jungen Zellen ist diese Inkrustierung nur schwach ausgeprägt (Hölker *et al.*, 2004), was daraufhin weist, dass die Melanisierung mit zunehmenden Zellalter stärker wird.

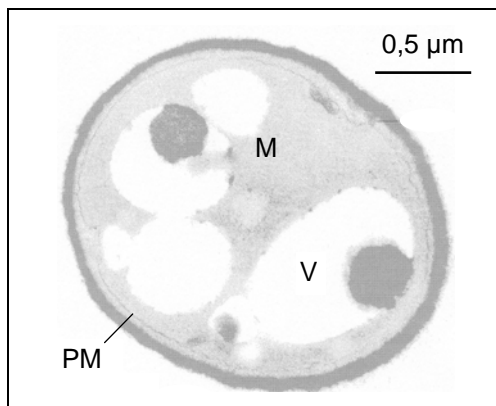


Abb. 2: Transelectronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *H. acidophila*. Deutlich zu sehen ist die dunkle, durch Melanineinlagerungen verdickte Zellwand. Darunter liegt die Plasmamembran (PM). Die Vakuolen enthalten Einlagerungen einer osmiophilen granulären Substanz (V). M kennzeichnet ein Mitochondrium (aus Hölker *et al.* 2004).

1.1.1 Systematische Einordnung von *H. acidophila*

Nach dieser ersten physiologischen Charakterisierung stellte sich die Frage, wie *H. acidophila* phylogenetisch einzuordnen ist. Die systematische Einordnung von Pilzen ist aus mehreren Gründen schwierig. So gibt es z. B. bei vielen Pilzen sexuelle (teleomorphe) und asexuelle (anamorphe) Formen, die sich in der Morphologie stark unterscheiden. Genetische Methoden wie die Sequenzierung ribosomaler DNA (rDNA), so z. B. ITS- (internal transcribed spacer) und SSU-Sequenzierungen (small subunit), bringen zwar Verbesserungen, doch sind nicht alle Pilze genetisch zugänglich und filamentöse Pilze stellen häufig ein genetisches Mosaik dar (Guarro *et al.*, 1999), so dass Individuen nicht immer voneinander unterschieden werden können.

H. acidophila wurde auf Grund seiner morphologischen Merkmale und basierend auf SSU rDNA-Sequenzierung als neue Art der Gattung *Hortaea* beschrieben. Damit gehört der Pilz zur Klasse der Ascomyceten, die von den vier großen Pilzkassen (Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota und Basidiomycota), mit 50 % aller bekannten Pilzarten die größte Gruppe ist (Guarro *et al.*, 1999). Die morphologischen Eigenschaften, vor allem die Konidiogenese, sprachen für eine Zuordnung zur Gattung *Exophiala* (Chaetothyriales), doch rückten die molekularbiologischen Daten den Pilz in die Gattung *Hortaea* (Dothideales). Die Ordnung Dothideales ist mit den zurzeit bekannten 58 Familien und 5.000 Arten ausgesprochen variabel (Guarro *et al.*, 1999). Nächster und bisher auch einzig bekannter Verwandter in der Gattung

Hortaea ist *Hortaea werneckii* (Hölker *et al.*, 2004). Die Sequenzabweichung von mehr als 16 % in den ITS-Sequenzen und die Unterschiede im physiologischen Profil weisen jedoch daraufhin, dass diese Verwandtschaft nicht sehr eng ist. *H. werneckii* ist vor allem interessant, weil der Organismus bei 20 % NaCl wächst und damit halophil ist (Zalar *et al.*, 1999). Für die meisten nahen Verwandten von *H. acidophila* ist ein Wachstum auf Steinen (epilithisch) oder auf Blättern (epiphyllisch) bekannt, beides Standorte, die ebenfalls durch niedrige Wasseraktivitäten charakterisiert sind (Butin *et al.*, 1996; Eriksson, 1981).

1.1.2 Definition und Bedeutung von „schwarzen Hefen“

Die oben genannten Eigenschaften legten es nahe, *H. acidophila* als so genannte schwarze Hefe zu bezeichnen. Dieser Begriff wurde für Pilze geprägt, die ein einzelliges Wachstumsstadium aufweisen und melanisiert sind (de Hoog, 1993). Schwarze Hefen sind seit dem 19. Jahrhundert bekannt, doch sind sie bisher nur lückenhaft erforscht. Die Taxonomie ist schwierig, da das Wachstum in verschiedenen Habitaten einen starken Einfluss auf die Morphologie hat. Schwarze Hefen sind zudem eine paraphyletische Gruppe (de Hoog, 1993; Guarro *et al.*, 1999), da sie in verschiedenen ascomycetischen Ordnungen vorkommen (Dothideales, Chaetothyriales und Pleosporales), und manchmal sogar basidiomycetische Pilze dazu gezählt werden (z. B. *Cryptococcus neoformans*).

Besondere Bedeutung haben die schwarzen Hefen dadurch erlangt, dass viele von ihnen opportunistisch oder sogar pathogen sind. Während die meisten Pilze in erster Linie Hautmykosen verursachen wie z. B. *H. werneckii* (de Hoog & Gerrits van den Ende, 1992) und *Botryomyces caespitosus* (Benoldi *et al.*, 1991), können einige Pilze wie *C. neoformans* und *Exophiala dermatitidis* cerebrale und systemische Infektionen mit hoher Mortalität verursachen (Szanislo 2002; Horré & de Hoog, 1999). Problematisch ist die dicke, melanisierte Zellwand, die die Pilze vor toxischen Metaboliten des Immunsystems ebenso schützt wie vor Antibiotika und – bei Pflanzenpathogenen – vor Fungiziden. Interessanterweise gibt es vor allem in der Ordnung Dothideales viele extremotolerante Vertreter (de Hoog *et al.*, 1999).

1.2 Eigenschaften, Vorkommen und Funktion von Melanin

Als Melanine bezeichnet man alle dunklen, meist schwarzen Makromoleküle bestehend aus verschiedenen phenolischen und indolischen Monomeren, die oft mit Proteinen und Kohlenhydraten komplexiert sind (Butler & Day, 1998). Es handelt sich um negativ geladene hydrophobe Pigmente mit hohem Molekulargewicht (Nosanchuk & Casadevall, 2003). Da die genaue Struktur dieser komplexen Moleküle weitgehend unbekannt ist, erfolgt die Einordnung

als Melanin meist an Hand von physikalischen und chemischen Parametern wie der Unlöslichkeit in kaltem oder kochendem Wasser und organischen Lösungsmitteln, der Resistenz gegen Abbau in kalten oder heißen Säuren, der Bleichbarkeit durch oxidierende Agenzien und des Abbaus in heißen Alkalilösungen (Butler & Day, 1998).

Melanine kommen sowohl bei Bakterien als auch im Tier- und Pflanzenreich vor. Das Bakterium *Azotobacter chroococcum* setzt sein Melanin wahrscheinlich zum Schutz der Nitrogenase vor Sauerstoff ein (Butler & Day, 1998). Bei Säugetieren schützen Melanine die Haut durch Bräunung vor UV-Strahlung, während sie in den Chromatophoren einiger Cephalopoden wie *Sepia officinalis* eine schnelle Anpassungen an einen dunklen Untergrund ermöglichen (Bell & Wheeler, 1986). Insekten schützen sich durch die Synthese von Melanin gegen eindringende Mikroorganismen (Nosanchuk & Casadevall, 2003) und bei Pflanzen werden Melanine mit der Immunantwort (Bell & Wheeler, 1986) in Verbindung gebracht.

Die Aufgaben der Melanine sind vielfältig, wobei die meisten im Zusammenhang mit Schutz vor ungünstigen Umwelteinflüssen zu sehen sind. Dieser Schutzfaktor kommt auch bei Pilzen zum Tragen, die Melanine in ihre Zellwand einlagern können und damit extremen Bedingungen trotzen können (Butler & Day, 1998; Bell & Wheeler, 1986). Neben UV-Strahlung schützen die Melanineinlagerungen gegen Austrocknung, Infrarotstrahlung und niedrige pH-Werte sowie osmotischen Stress. Sie verhindern die Zelllyse durch Abfangen lytischer Enzyme sowie von oxidierenden Agenzien und toxischen Stoffen wie z. B. Phytoalexinen. Zudem kann Melanin freie Radikale neutralisieren, als Redoxpuffer dienen (Jacobsen, 2000) und toxische Metalle wie Kupfer abfangen (Gadd & de Rome, 1988, Caesar-Tonthat *et al.*, 1995).

Gleichzeitig ist Melanin ein Virulenzfaktor (Henson *et al.*, 1999). Viele Pflanzenpathogene wie *Colletotrichum lagenarium* und *Magnaporthe grisea* synthetisieren Melanin in den Appressorien, mit denen sie in die Wirtszellen eindringen (Langfelder *et al.*, 2003). Die durch Melanin verdickten Zellwände werden benötigt, um den hohen Turgordruck in den Appressorien aufrechtzuerhalten. Humanpathogene Arten können sich mit Hilfe von Melanin dem Immunsystem des Wirts entziehen (Hamilton & Gomez, 2002).

1.2.1 Melanin in Pilzen

Melanin kommt in Pilzen vor allem extrazellulär oder assoziiert mit der Zellwand vor (Bell & Wheeler, 1986). Extrazelluläres Melanin kann durch Autooxidation gebildet werden (heterogenes Melanin), wenn Melaninvorstufen in das Medium sezerniert werden, doch können auch an der Melaninbildung beteiligte Enzyme wie Laccasen zusammen mit den Vorstufen in das

Medium sezerniert werden. Frei im Cytoplasma liegt Melanin bei Pilzen nicht vor, doch können dort melanosomenartige Organellen vorkommen (San-Blas *et al.*, 1996). Es gibt viele Melaninarten, die sich in ihrer Synthese und in den verwendeten Ausgangsstoffen unterscheiden. Hier soll nur auf die häufigsten bei Pilzen vorkommenden Melanine eingegangen werden (Butler & Day, 1998).

DOPA-Melanin:

Das DOPA-Melanin tritt bei Pilzen häufig auf, doch ist die Fähigkeit zur *de novo* Synthese selten. Tyrosin und L-DOPA (Dihydroxyphenylalanin) werden als Monomere verwendet, als Schlüsselenzym dient die Tyrosinase, eine kupferhaltige Catecholoxidase. Der häufig als schwarze Hefe bezeichnete Basidiomycet *Cryptococcus neoformans* produziert DOPA-Melanin, jedoch nur, wenn L-DOPA oder Dopamin als Vorstufen im Medium zur Verfügung stehen, da ihm die Fähigkeit zur Synthese von L-DOPA aus Tyrosin mittels Tyrosinase fehlt.

DHN-Melanin:

Das häufigste bei Pilzen gebildete Melanin ist DHN-Melanin. Als Ausgangsprodukt dient hier 1,8-Dihydroxynaphthalen (DHN). Die Anwesenheit von DHN-Melanin lässt sich nachweisen, indem spezifische Hemmstoffe wie z. B. Tricyclazol oder Capropamid eingesetzt werden. Für einige Pilze wie *Gaeumannomyces graminis*, *Aureobasidium pullulans* (Caesar-Tonthat *et al.*, 1995), *Cochliobolus heterostrophus* (Tanaka *et al.*, 1992), *Hortaea werneckii* (Kogej *et al.*, 2004) und *Colletotrichum lagenarium* (Tsuji *et al.*, 2001) wurde dieser Beweis inzwischen erbracht. Versuche mit Capropamid (Pracht, 2002) und Tricyclazol (Bend, 2005) deuten daraufhin, dass auch *H. acidophila* DHN-Melanin besitzt. Das Schlüsselenzym dieses Synthesewegs, eine Polymerase, die 1,8-DHN zu Melanin vernetzt, kann u. a. eine Tyrosinase oder eine Laccase sein (Abb. 3).

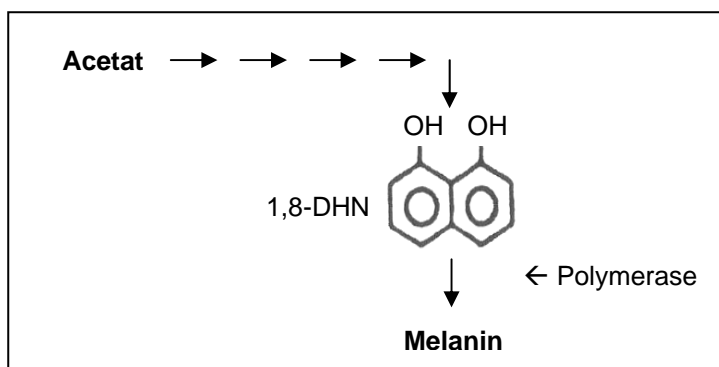


Abb. 3: Polyketid-Syntheseweg des DHN-Melanins. Die Ausgangssubstanz Acetat wird in mehreren Schritten zu 1,8-DHN umgewandelt, welches z. B. durch eine Tyrosinase oder eine Laccase zum Melanin polymerisiert wird. (Butler & Day, 1998).

GHB-Melanin:

Die Synthese von GHB-Melanin erfolgt ausgehend von γ -Glutaminyl-4-hydroxybenzen (GHB) im Shikimate-Syntheseweg. An der Oxidation von GHB sind Tyrosinasen beteiligt. Diese Melaninart ist bisher nur bei *Agaricus bisporus* beschrieben worden. Da jedoch GHB bei vielen Basidiomyceten gefunden wurde, liegt der Verdacht nahe, dass GHB-Melanin das typische Melanin der Basidiomyceten ist, ebenso wie DHN-Melanin das typische Melanin der Ascomyceten ist.

Catechol-Melanin:

Der Maisbeulenbranderreger *Ustilago maydis* produziert in seinen Sporen Melanin, dessen Ausgangssubstanzen Catechole sind (Bell & Wheeler, 1986). Die Herkunft dieser Catechole ist noch unbekannt, wird aber im Zusammenhang mit dem Shikimate Syntheseweg vermutet.

1.3 Eigenschaften von Laccasen

Laccasen gehören zu den Polyphenoloxidasen (p-Benzendiol: O₂-Oxidoreduktase, EC1.10.3.2) und wurden erstmals 1883 aus dem Lack-Baum (*Rhus vernicifera*) isoliert, was ihnen den Trivialnamen gegeben hat (Yoshida, 1883). Außer in Pflanzen kommen sie in Bakterien und Insekten, vor allem aber in Pilzen vor (Thurston, 1994; Gianfreda *et al.* 1999; Claus, 2003). In den beiden pilzlichen Großgruppen, den Basidiomyceten (Ständerpilze) und Ascomyceten (Schlauchpilze) erfüllen Laccasen jedoch unterschiedliche Funktionen. Während sie bei basidiomycetischen Weißfäulepilzen am oxidativen Abbau von Lignin beteiligt sind, katalysieren sie in Ascomyceten die Synthese von komplexen Polymeren wie z. B. Melanin (Gianfreda *et al.*, 1999; Bell & Wheeler, 1986). Die nächsten Verwandten der Laccasen sind Ascorbatoxidasen und das Säugerplasma Protein Ceruloplasmin, welches u. a. an Entzündungsprozessen beteiligt ist (Messerschmidt & Huber, 1990).

Das katalytische Zentrum der Laccasen enthält vier Kupferatome, ein einzelnes Typ1-Kupferatom und ein trinukleäres Cluster aus einem Typ2- und zwei Typ3-Kupferatomen (Abb. 4). Dadurch gehört die Laccase zur Familie der großen blauen Kupferproteine, auch blaue Kupferoxidasen genannt (Thurston, 1994). Die Oxidation eines Substrates erfolgt durch Abgabe eines Elektrons an das Typ1-Kupferatom. Von dort wird das Elektron über den trinuklearen Kupfercluster zum terminalen Elektronenakzeptor, dem molekularen Sauerstoff O₂, weitergeleitet. Dieser wird durch insgesamt 4 Elektronen zu H₂O reduziert. Laccasen besitzen ein elektropositives Redoxpotenzial von etwa +800 mV (Gianfreda *et al.*, 1999). Das pH-Optimum liegt in Abhängigkeit vom Substrat im Allgemeinen zwischen 4,0 und 7,0 (Sulistyaningdyah *et al.*,

2004). Es handelt sich in der Regel um extrazelluläre Enzyme, die eine große Stabilität aufweisen und mit einem Kohlenhydratanteil von 15-20 % meist stark glykosyliert sind. Das Molekulargewicht der deglykosylierten Proteine beträgt 60-80 kDa (circa 480-650 Aminosäuren), wobei neben Monomeren, Dimere und Tetramere auftreten können (Thurston, 1994).

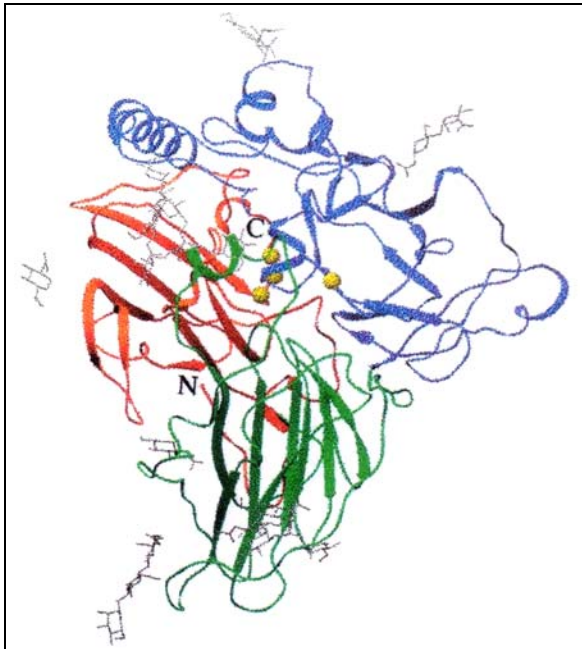


Abb. 4: Dreidimensionale Struktur der Laccase von *Melanocarpus albomyces*. Das mononukleare Kupfer liegt in der Domäne C (blau), das trinukleare Cluster liegt zwischen Domäne A (rot) und Domäne C. Die Bindestelle für das diphenolische Substrat befindet sich im Spalt zwischen Domäne B (grün) und Domäne C. Kohlenhydrate sind grau dargestellt. (aus Hakulinen *et al.* 2002).

1.3.1 Funktionen und Oxidationsmechanismus der Laccasen

Laccasen sind Enzyme mit einem breiten, relativ unspezifischen Substratspektrum, welches sich z. T. mit dem der Tyrosinase überlappt. Bekannte Substrate sind einkernige Diphenole, Catechole wie 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und einkernige methoxy-substituierte Monophenole wie Guaiacol und 2,6-Dimethoxyphenol (DMOP), wobei letztere in der Regel besser oxidiert werden. Monophenole ohne Methoxygruppen wie Tyrosin können dagegen nicht oxidiert werden. Syringaldazin, eine für die Messung der Laccaseaktivität häufig genutzte Substanz, ist spezifisch für Laccasen, sofern durch Abwesenheit von H_2O_2 die Wirkung einer Peroxidase ausgeschlossen ist. Es handelt sich bei dieser Substanz um zwei methoxy-substituierte einkernige Monophenole, die über zwei Aminogruppen miteinander verbunden sind. Weitere Substrate sind mehrkernige Polyphenole wie 1,8-Dihydroxynaphthalen (DHN) und mehrkernige Diamine wie 1,6-Diaminonaphthalen (DAN), zudem nicht-phenolische Komponenten wie Ascorbinsäure und das künstliche Laccasesubstrat ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)).

Die Laccase entzieht den Substraten ein Elektron, so dass ein Radikal (meist ein Phenoxyradikal) entsteht, welches mit einer weiteren enzymkatalysierten Oxidation oder Hydratation

oder mit einer spontanen Polymerisation reagieren kann. Unter Einsatz von Mediatoren wie dem ABTS können weitere Substrate oxidiert werden (Bourbonnais *et al.*, 1995). Die Oxidation durch das Kationradikal ABTS^+ ist dabei beschränkt auf phenolische Gruppen, doch können nicht-phenolische Reste über ABTS^{2+} oxidiert werden (Bourbonnais *et al.*, 1998).

Auf Grund ihrer unspezifischen Reaktionsweise sind Laccasen an vielen Reaktionen beteiligt. Bei Pflanzen spielen sie eine Rolle bei der Wundheilung (Nitta *et al.*, 2002) und ihre Beteiligung an der Ligninsynthese in Pflanzen wird diskutiert (Bao *et al.*, 1993; Ranocha *et al.*, 1999). Die Fähigkeit zum Ligninabbau ist dagegen bei Basidiomyceten weit verbreitet, vor allem bei der als Weißfäulepilze bezeichneten Gruppe (Leonowicz *et al.*, 2001). Bei Ascomyceten stehen dagegen Syntheseprozesse im Vordergrund. Eine Laccase ist für die Synthese des grünen Sporenpigmentes des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans* verantwortlich (Thurston, 1994), und bei vielen melanisierten Pilzen katalysiert eine Laccase den letzten Syntheseschritt der Melaninproduktion, wie Abbildung 3 zeigt.

Gleichzeitig sind Laccasen Virulenzfaktoren, sowohl bei pflanzenpathogenen als auch humanpathogenen Arten. Bei den Erregern von Wein- und Kastanienfäule (*Botrytis cinerea* und *Cryphonectria parasitica*) ist nachweislich eine Laccase in die Pathogenität verwickelt (Thurston, 1994). Der Shiitake-Pilz, *Lentinula edodes*, produziert Laccasen als Abwehr von *Trichoderma*-Arten, die Zellwände anderer Pilze lysieren und auf diesen Pilzen parasitieren (Henson *et al.*, 1999). Laccasen können dazu dienen, Phytoalexine zu inaktivieren (Mayer & Staples, 2002), doch können auch inaktive Vorstufen dieser Pflanzenschutzstoffe gerade erst durch die Wirkung einer Laccase aktiviert werden (Schouten *et al.*, 2002). Die Laccase des humanpathogenen Basidiomyceten *C. neoformans* schützt den Pilz vor alveolären Makrophagen durch eine Oxidation von Eisen, die die Menge an Fe^{2+} herabsetzt und so den oxidativen Angriff der Makrophagen abschwächt oder ganz verhindert (Zhu *et al.*, 2001).

1.3.2 Industrielle Anwendungen von Laccasen

Laccasen werden auf Grund ihrer Fähigkeit Lignin abzubauen, schon seit geraumer Zeit in großindustriellem Maßstab eingesetzt. So werden die Laccasen aus Weißfäulepilzen verwendet, um Papier schonend zu bleichen und Abwässer, die bei der Papiererzeugung auftreten, aufzubereiten (Sigoillot *et al.*, 2004). Das gleiche Prinzip kann auch in der Textilindustrie verwendet werden, um Baumwolle durch Entfernung von Ligninbestandteilen zu bleichen. Zudem dienen Laccasen in der Getränkeaufbereitung zur Entfernung von Phenolen und als Biosensoren zur Aufspürung dieser Substanzen in Säften und von Catecholen in Tee (Gianfreda *et al.*, 1999). Weitere Anwendungen beschäftigen sich mit Umweltschutzaspekten. Die Laccasen dienen hier

zur Entfernung toxischer Substanzen aus Wasser und Boden (Gianfreda *et al.*, 1999; Junghanns *et al.*, 2005), die z. B. aus Herbiziden, Holzschutzmitteln und der Benzinindustrie stammen können (Bollag *et al.*, 1988). Die Substanzen werden polymerisiert und verlieren dadurch ihre Toxizität oder aber werden durch Reaktion mit anderen Substanzen ausgefällt, so dass sie dem Ökosystem entzogen werden.

Während die Abbauleistungen der Laccasen bereits intensiv genutzt werden, wird der Einsatz der Syntheseleistungen erst in jüngerer Zeit diskutiert. Neue Wirkstoffe für Pharmazie, Medizin und Pflanzenschutz werden häufig in Naturstoffen gefunden, die jedoch gezielt modifiziert werden müssen (Lindequist & Schauer, 2002). Meist zerstören harsche chemische Reaktionen diese Naturstoffe oder schwächen zumindest ihre Wirkung ab, weshalb Enzyme für die Durchführung schonender Modifikationen gesucht werden. Laccasen sollten in der Lage sein, eine Kopplung verschiedener Substanzen, Derivatisierungen und Neusynthesen durchzuführen. So wurden bereits Laccasen benutzt, um Steroide in organischer Synthese zu oxidieren (Yaropolov *et al.*, 1994) und Acetamide in Imidazole umzuwandeln (Schäfer *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden mit Hilfe von Laccasen bereits neue Wirkstoffe mit antibiotischer Wirkung erzeugt (Pilz *et al.*, 2003). Diese Methoden sollten in der Zukunft weitere Anwendung finden, da gerade Polyphenole, die natürlichen Substrate von Laccasen, durch ihre Eigenschaft als Antioxidantien medizinisch wertvoll sind. Sie schützen vor Krebs, Schlaganfall und koronarer Herzkrankheit und Resveratrol, ein weiteres Polyphenol, wirkt antikarzinogen (Tapiero *et al.*, 2002). Bei allen diesen Anwendungen sind bisher nur Laccasen aus Basidiomyceten zum Einsatz gekommen. Die Erforschung von ascomycetischen Laccasen scheint allerdings vielversprechend, da diese im Unterschied zu basidiomycetischen Laccasen überwiegend Synthesen statt Abbaureaktionen katalysieren, und deshalb für organische Synthesen in besonderem Maße geeignet sein sollten.

1.3.3 Laccasen aus Basidiomyceten

Obwohl das erste beschriebene Laccasegen aus dem Ascomyceten *Neurospora crassa* stammte, sind die basidiomycetischen Laccasen wesentlich besser erforscht als die der Ascomyceten. Dies liegt zum Einen an der Tatsache, dass Laccasen von basidiomycetischen Weißfäulepilzen industriell genutzt werden, zum Anderen daran, dass basidiomycetische Laccasen relativ stark konserviert sind, und deshalb auf molekularer Ebene leichter zu erforschen sind als ascomycetische Enzyme. Pilze, deren Laccasen bereits auf molekularer Ebene untersucht wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Laccasen aus weiteren Pilzen wie *Phanerochaete chrysosporium* (Garavaglia *et al.*, 2004) und *Rigidoporus lignosus* (Larrondo *et al.*, 2003) sind zumindest auf Proteinebene charakterisiert.

Tab. 1: Basidiomycetische Pilze, deren Laccasen auf molekularer Ebene untersucht sind. Die meisten dieser Pilze gehören zu den Weißfäulepilzen (W), einige sind Speisepilze (S) oder human- (HP) bzw. pflanzenpathogen (PP), PA = Pflanzen assoziiert.

Gruppe	Organismus	Quelle
W	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Karahanian <i>et al.</i> , 1998
W	<i>Clitocybula dusenii</i>	Scheel <i>et al.</i> , 1999
W	<i>Coprinus cinereus</i>	Yaver <i>et al.</i> , 1999
W	<i>Nematoloma frowardii</i>	Scheel <i>et al.</i> , 1999
W	<i>Phlebia radiata</i>	Saloheimo <i>et al.</i> , 1991
W	<i>Pleurotes ostreatus</i> , <i>P. eryngii</i>	Giardina <i>et al.</i> , 1995; Muñoz <i>et al.</i> , 1997
W	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Eggert <i>et al.</i> , 1998
W	<i>Schizophyllum commune</i>	Hatamoto <i>et al.</i> , 1999
W	<i>Trametes villosa</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>T. trogii</i>	Yaver <i>et al.</i> , 1996 ; Jönssen <i>et al.</i> , 1997; Colao <i>et al.</i> , 2003
S	<i>Agaricus bisporus</i>	Perry <i>et al.</i> , 1993
S	<i>Lentinula edodes</i>	Zhao & Kwan, 1999
S	<i>Volvariella volvaceae</i>	Chen <i>et al.</i> , 2004
HP	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Williamson, 1994
PP	<i>Heterobasidium annosum</i>	Asiegbu <i>et al.</i> , 2004
PP	<i>Rhizoctonia solani</i>	Wahleitner <i>et al.</i> , 1996
PA	<i>Marasmius quercophilus</i>	Dedeyan <i>et al.</i> , 2000

Die untersuchten Laccasen und Laccasegene weisen untereinander große Ähnlichkeiten auf. Die Gene enthalten eine variable Anzahl von Introns (8 bei *T. villosa* bis 19 bei *P. ostreatus*), deren Position jedoch konserviert ist (Fernandez-Larrea & Stahl, 1996). Die Proteine sind in ihrer Aminosäuresequenz mit 50 % bis 98 % Identität sehr homolog zueinander (z. B. Hatamoto *et al.*, 1999; Asiegbu *et al.*, 2004; Hoegger *et al.*, 2004). Homologien zu ascomycetischen Laccasen sind dagegen deutlich geringer (Ong *et al.*, 1997; Giardina *et al.*, 1995, d'Souza *et al.*, 1996). Inzwischen sind die Kristallstrukturen mehrerer basidiomycetischer Laccasen bekannt. Dazu zählen *T. versicolor* (Piontek *et al.*, 2002), *C. cinereus* (Ducros *et al.*, 1997), *R. lignosus* (Garavaglia *et al.*, 2004), *P. cinnabarinus* (Antorini *et al.*, 2002) und *C. hirsutus* (Pegasova *et al.*, 2003). Obwohl die Expression vieler Laccasegene durch Induktoren stark gesteigert werden kann (Yaver *et al.*, 1996), ist die Proteinausbeute meist sehr gering. Deshalb wurden bereits mehrere biotechnologisch interessante Laccasen in Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica* und *Yarrowia lipolytica* und in filamentösen Pilzen wie *Aspergillus spec.*, *Trichoderma reesei* und *P. cinnabarinus* (Alves *et al.*, 2004) durch heterologe Expression produziert.

1.3.4 Laccasen aus Ascomyceten

Bereits 1988 wurde das erste ascomycetische Laccasegen aus *Neurospora crassa* kloniert (Germann *et al.*, 1988). Doch erst seit kurzem werden ascomycetischen Laccasen und vor allem ihre Gene umfassender untersucht (Tab. 2). Einige dieser Laccasen sind thermophil (z. B. aus *M. thermophila* und *M. albomyces*), eine alkaliphile Laccase mit einem pH-Optimum von 9,0 aus *Myrothecium verrucaria* wurde aufgereinigt und charakterisiert (Sulistyaningdyah *et al.*, 2004).

Tab. 2: Ascomycetische Pilze, deren Laccasen auf molekularer Ebene untersucht sind. Die meisten dieser Pilze sind pflanzenpathogen (PP), andere sind saprophytische Schimmelpilze (SP). *M. albomyces* weist ein Hefestadium auf (H).

Gruppe	Organismus	Quelle
PP	<i>Botrytis cinerea</i>	Schouten <i>et al.</i> , 2002
PP	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Tsuji <i>et al.</i> , 2001
PP	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Rigling & van Alfen, 1991; Choi <i>et al.</i> , 1992
PP	<i>Fusarium proliferatum</i>	Kwon & Anderson, 2002
PP	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Edens <i>et al.</i> , 1999; Litvintseva & Henson, 2002
PP	<i>Magnaporthe grisea</i>	Tsuji <i>et al.</i> , 2000
SP	<i>Aspergillus nidulans</i>	Aramayo & Timberlake, 1990; Scherer & Fischer, 2001
SP	<i>Chaetomium thermophilum</i>	Chefetz <i>et al.</i> , 1998
SP	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Berka <i>et al.</i> , 1997
SP	<i>Neurospora crassa</i>	Germann <i>et al.</i> , 1988
SP	<i>Podospora anserina</i>	Fernandez-Larrea & Stahl, 1996
H	<i>Melanocarpus albomyces</i>	Kiiskinen & Saloheimo, 2004

Genetische Studien an ascomycetischen Laccasen sind vergleichsweise schwierig, da die Laccasen untereinander nicht so stark konserviert sind wie die basidiomycetischen (Berka *et al.*, 1997; Fernandez-Larrea & Stahl, 1996). Sie weisen mit 1-6 Introns insgesamt weniger Introns auf als die basidiomycetischen, wobei auch 12 Introns (*C. parasitica*) vorkommen können. Zudem ist die Lage der Introns nicht konserviert, was daraufhin weist, dass Laccasen erst nach der Trennung von Ascomyceten und Basidiomyceten evolviert sind (Fernandez-Larrea & Stahl, 1996; Berka *et al.*, 1997). Die Homologien zwischen ascomycetischen und basidiomycetischen Laccasen ist mit etwa 20 % so gering, dass von basidiomycetischen Sequenzen abgeleitete Primer und Gensonden meist nicht verwendet werden können (Berka *et al.*, 1997). Auch untereinander liegen die Homologien der ascomycetischen Laccasen bei

höchstens 76 % Identität (Laccasen aus *M. albomyces* und *M. thermophila*, Bulter *et al.*, 2003) und oft bei unter 40 %, selbst bei verschiedenen Laccasegenen des gleichen Organismus (*A. nidulans*, Scherer & Fischer, 2001). Die einzigen Sequenzbereiche, die eine nennenswerte Konservierung aufweisen, sind die so genannten Kupferbindesequenzen, die für Bereiche kodieren, die im Protein an der Kupferbindung beteiligt sind. Mit Hilfe von Primern, die ausgehend von diesen Sequenzen abgeleitet werden, ist es möglich, durch Polymerasekettenreaktion Laccasegene in verschiedenen Pilzen nachzuweisen. So konnten z. B. Laccasegene in Pilzen nachgewiesen werden, die auf verrottenden Pflanzen in Salzmarschgebieten wuchsen, ohne dass näheres über diese Pilze bzw. ihre Laccasen bekannt war (Lyons *et al.*, 2003).

Trotz der genannten Probleme steht seit kurzem eine Kristallstruktur von der Laccase des Ascomyceten *M. albomyces* zur Verfügung (Hakulinen *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde die Laccase bereits heterolog in *S. cerevisiae* (Kiiskinen & Saloheimo, 2004) und in *T. reesei* (Kiiskinen *et al.*, 2004), exprimiert. Als weitere ascomycetische Laccase wurde die von *M. thermophila* in *A. oryzae* (Berka *et al.*, 1997) und in *S. cerevisiae* (Bulter *et al.*, 2003) exprimiert. Expressionsstudien an einigen Pilzen wiesen zudem nach, dass sowohl konstitutiv exprimierte als auch induzierte Laccasegene vorkommen (z. B. Litvintseva & Henson, 2002). Die Induktion findet häufig durch Kupfer statt (Huber & Lerch, 1987; Fernandez-Larrea & Stahl, 1996) oder durch aromatische Substanzen wie z. B. bei *Botryosphaeria* spec. (Alves da Cunha *et al.*, 2003).

1.3.5 Laccasen aus melanisierten Pilzen

Obwohl seit längerem bekannt ist, dass Laccasen an der Synthese von DHN-Melanin beteiligt sind (Butler & Day, 1998), gibt es kaum Studien über die Funktion der untersuchten Laccasen, wenn diese aus melanisierten Pilzen stammten. Für das marine Bakterium *Marinomonas mediterranea* (Lucas-Elío *et al.*, 2002) wurde dagegen eine Beteiligung der Laccasen an der Melaninsynthese nachgewiesen. Bei Pilzen wurden die meisten Studien zum Zusammenhang von Melaninsynthese und Laccasen für den humanpathogenen Basidiomyceten *C. neoformans* durchgeführt, doch ist dieser Pilz weder zur Bildung von DHN-Melanin noch überhaupt zur *de novo*-Melaninsynthese befähigt (Williamson, 1994). Die Laccase von *L. edodes* zumindest scheint an der Melaninsynthese beteiligt zu sein (Nagai *et al.*, 2003). Bei *A. nidulans* ist nachgewiesen, dass die Laccase I mit der Synthese des grünen Sporenpigments assoziiert ist (Scherer & Fischer, 2001). Das gleiche gilt für die Sporen des humanpathogenen *A. fumigatus* (Youngchim *et al.*, 2004). Die Beteiligung der Laccasen aus *P. anserina* an der

Melaninsynthese wird zumindest diskutiert (Fernandez-Larrea & Stahl, 1996). Bei dem DHN-Produzenten *C. lagenarium* (Tsuji *et al.*, 2001), zeigte sich, dass das Genprodukt des untersuchten Laccasegens keinen direkten Einfluss auf die Melaninsynthese hatte, was jedoch eine Beteiligung an dem Syntheseweg nicht ausschließt. Für *G. graminis* wurde dagegen eine Beteiligung der Laccase an der Melaninsynthese zumindest *in vitro* nachgewiesen (Edens *et al.*, 1999). Für die meisten beschriebenen Laccasen aus Melaninproduzenten ist ihre Beteiligung an der Melaninsynthese jedoch nicht untersucht.

Über die Anwesenheit von Laccasen in schwarzen Hefen, zu denen *H. acidophila* gehört, ist bisher wenig bekannt. Bei gut untersuchten Vertretern dieser Gruppe wie *Cladosporium spec.*, *Exophiala spec.*, *Aureobasidium pullulans* und *Hortaea werneckii* ist bislang weder eine Laccase noch ein Laccasegen beschrieben, obwohl z. T. bekannt ist, dass diese Pilze DHN-Melanin bilden (Kogej *et al.*, 2004; Caesar-Tonthat *et al.*, 1995). Hinzu kommt, dass bei diesen Organismen insgesamt nur wenige genetische Methoden etabliert sind. Auf Grund der Tatsache, dass vergleichsweise wenig über ascomycetische Laccasen bekannt ist, diese aber große Relevanz haben, da sie durch ihre Beteiligung an der Melaninsynthese als Pathogenitätsfaktor und vor allem für den biotechnologischen Einsatz in Frage kommen, ist die weitere Erforschung ascomycetischer Laccasen wünschenswert.

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Über den acidophilen Ascomyceten *Hortaea acidophila* war zu Beginn dieser Arbeit so gut wie nichts bekannt. Auf Grund der Tatsache, dass der Pilz Melanin bildet, ließ sich vermuten, dass er eine Laccase besitzt, die an dieser Melaninbildung beteiligt ist und dass dieses Enzym möglicherweise interessante Eigenschaften für eine biotechnologische Nutzung besitzt. Um es biotechnologisch nutzen zu können, ist allerdings eine heterologe Expression notwendig, da die Ausbeute der Laccasen bei *H. acidophila* gering ist. Voraussetzung ist, dass für die Laccase kodierende Gen zu isolieren. Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es daher, *H. acidophila* für genetische Arbeiten zu erschließen und mit Hilfe dieser Methoden das Laccasegen aufzuspüren. Die Arbeit umfasst folgende Schritte, wobei die Etablierung molekularbiologischer Methoden für *H. acidophila* besondere Berücksichtigung verdient:

- enzymatischer bzw. proteinbiochemischer Nachweis einer funktionsfähigen Laccase
- molekularer Nachweis des/der Laccasegene über Polymerasekettenreaktion
- Isolierung der Laccasegene ausgehend von genomischer DNA
- Analyse der Gensequenzen und der dazugehörigen hypothetischen Proteinsequenzen

Da sich im Laufe der Arbeit herausstellte, dass *H. acidophila* mehrere Laccasegene besitzt, wurde die Isolierung der vollständigen Gene auf zwei Laccasegene beschränkt. Von zwei weiteren Genen wurden Teile der Sequenz ermittelt. So stehen genug Informationen über die Gene zur Verfügung, um ihre heterologe Expression zu etablieren, sobald die gewünschte Laccase auf enzymatischer Ebene ausreichend charakterisiert ist, um eine Expression zu rechtfertigen.

2 Material und Methoden

Verwendete Abkürzungen werden bei der ersten Verwendung im Text erklärt. Zusätzlich sind sie im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt (7.1). Abkürzungen, die als bekannt vorausgesetzt werden (DNA) oder die sich auf Chemikalien beziehen (SDS), werden nur im Abkürzungsverzeichnis erklärt, sofern der volle Name nicht zum Verständnis notwendig ist.

2.1 Verwendete Mikroorganismen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Pilz *Hortaea acidophila* gearbeitet (Tab. 3). Es handelt sich bei diesem Organismus um einen melanisierten Ascomyceten aus der Ordnung der Dothideales. *H. acidophila* wurde aus einem Anreicherungsmedium mit Humin- und Fulvinsäuren als Kohlenstoffquelle bei pH 0,6 isoliert (Hölker *et al.*, 2004). Die genomische DNA des Ascomyceten *Trichoderma atroviride* wurde zur Kontrolle von Haushaltsgenprimern verwendet.

Tab. 3: Verwendete Pilzstämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>Hortaea acidophila</i> CBS 113389	Wildtyp	Hölker <i>et al.</i> , 2004
<i>Trichoderma atroviride</i> CBS 349	Wildtyp	Hölker <i>et al.</i> , 1999

Der Wirtsstamm *E. coli* XL1-Blue wurde für die Transformation mit Derivaten des Plasmids pGEM-T Easy (2.2) verwendet (Tab. 4). Für die Transformation mit dem Plasmid pBlueScript SK (+) wurde zusätzlich der Wirtsstamm *E. coli* XL1-Blue MRF' verwendet, da dieser für Restriktionsendonucleasen defizient ist und deshalb auch methylierte Fremd-DNA nicht hydrolysieren kann. Die Plasmide konnten durch Anzucht der Bakterien unter Selektionsdruck vermehrt werden.

Tab. 4: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^r ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene (La Jolla/CA, USA)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	Δ <i>mrcA</i>)183 Δ(<i>mrcCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^r ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene (La Jolla/CA, USA)

2.2 Verwendete Plasmide

Um DNA-Fragmente aus *H. acidophila* zu vermehren und zu sequenzieren, wurden diese in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors pGEM-T Easy kloniert (Tab.5). Der Vektor pBlueScript SK (+) wurde zur Herstellung einer partiellen genomischen DNA-Bank verwendet. Die resultierenden Plasmide wurden in den Wirtstamm *E. coli* XL1-Blue bzw. *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert und durch Anzucht der Bakterien vermehrt. Die in pGem-T Easy klonierten Fragmente sind PCR-Produkte, die mit Hilfe von laccasespezifischen Primern (2.12.1) amplifiziert wurden. Die Bezeichnung der Plasmide ergibt sich aus den Namen der Primer und gegebenenfalls der Fragmentlänge. Die in pBlueScript SK (+) sowie in pUC18 klonierten Fragmente sind Restriktionsfragmente genomischer DNA. Zur besseren Übersichtlichkeit ist hinter der Beschreibung der Plasmideigenschaften die DNA-Quelle für die PCR oder die Restriktionsspaltung angegeben (gDNA für genomische DNA, pX für ein Plasmid oder cbsX/X für ein PCR-Produkt).

Tab. 5a: Kommerziell erhältliche Plasmide (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
pGEM-T Easy	Amp ^r , <i>lacZ</i> , f1 ori, MCS	Promega (Madison/WI, USA)
pBlueScript SK (+)	f1 (+), <i>lacZ'</i> , MCS, pUC ori, Amp ^r	Stratagene (La Jolla/CA, USA)
pUC18	pBR322-Derivat, Amp ^r , <i>lacZ</i> , pMB1 replicon <i>rep</i> , MCS	Fermentas (St. Leon-Rot/Deutschland)

Tab. 5b: Plasmide, die Laccasegenfragmente enthalten (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
pcbs1/int-700	pGEM-T Easy MCS::cbs1-int, gDNA	diese Arbeit
pcbs1/2-160	pGEM-T Easy MCS::cbs1B-cbs2B, gDNA	diese Arbeit
pcbs2/int-450	pGEM-T Easy MCS::cbs2-int, gDNA	diese Arbeit
pcbs2/int-600	pGEM-T Easy MCS::cbs2-int, gDNA	diese Arbeit
pcbs2/3-1100	pGEM-T Easy MCS::cbs2-cbs3, gDNA	diese Arbeit
pint/cbs3-500	pGEM-T Easy MCS::int-cbs3, gDNA	diese Arbeit
pint/cbs4-650	pGEM-T Easy MCS::int-cbs4, gDNA	diese Arbeit
pint/cbs4-900	pGEM-T Easy MCS::int-cbs4, gDNA	diese Arbeit
pnested-450	pGEM-T Easy MCS::cbs2-int, cbs2/3	diese Arbeit
pnested-550	pGEM-T Easy MCS::cbs2-int, cbs2/3	diese Arbeit

Tab. 5c: Plasmide, die Restriktionsfragmente genomischer DNA enthalten (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
pB2i	pBlueScript SK (+) MCS:: <i>Bam</i> HI-Fragmente 2,0-2,5 kb, gDNA	diese Arbeit
pB2i-450	pGEM-T Easy MCS::cbs2-int, pB2i	diese Arbeit
pE2i	pBlueScript SK (+) MCS:: <i>Eco</i> RI-Fragmente 4,0-5,0 kb, gDNA	diese Arbeit
pE2i-450	pGEM-T Easy MCS::cbs2-int, pE2i	diese Arbeit
pB23	pBlueScript SK (+) MCS:: <i>Bam</i> HI-Fragmente 5,0-6,0 kb, gDNA	diese Arbeit
pE23	pBlueScript SK (+) MCS:: <i>Eco</i> RI-Fragmente 7,0-10,0 kb, gDNA	diese Arbeit
pUC-B23	pUC18 MCS:: <i>Bam</i> HI-Fragmente 5,0-6,0 kb, gDNA	diese Arbeit
pUC-E23	pUC18 MCS:: <i>Eco</i> RI-Fragmente 7,0-10,0 kb, gDNA	diese Arbeit

Tab. 5d: Plasmide, die Produkte der inversen PCR enthalten (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pB2i-inv	pGEM-T Easy MCS::5'inv2i-3'inv2i, gDNA <i>Bam</i> HI / selbstligiert	diese Arbeit
pE21-inv	pGEM-T Easy MCS::5'inv2i-3'inv2i, gDNA <i>Eco</i> RI / selbstligiert	diese Arbeit
pB23-inv	pGEM-T Easy MCS::5'inv23-3'inv23, gDNA <i>Bam</i> HI / selbstligiert	diese Arbeit
pE23-inv	pGEM-T Easy MCS::5'inv23-3'inv23, gDNA <i>Eco</i> RI / selbstligiert	diese Arbeit
pStu12-inv	pGEM-T Easy MCS::5'inv12-3'inv12, gDNA <i>Stu</i> I / selbstligiert	diese Arbeit

2.3 Nährmedien

Medien zur Anzucht und Stammhaltung von Pilzen

H. acidophila wurde auf PDA-Festmedium (Kartoffel-Dextrose-Agar) angezogen, welches fertig bezogen wurde (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Das komplexe Anzuchtsmedium für *H. acidophila* wurde sowohl als Flüssigmedium als auch als Festmedium verwendet. Für die Herstellung von Agarplatten musste der pH auf 5,1 erhöht werden, da der saure pH-Wert das Erstarren des Agars verhinderte. Es wurden 20 g Agar zu einem Liter Anzuchtsmedium gegeben.

<u>Anzuchtsmedium</u> (Hölker <i>et al.</i> , 2004)			<u>Spurenelementlösung</u> (modifiziert nach Hölker <i>et al.</i> , 1995)		
Glucose	12,0	g/l			
Trypton	4,0	g/l	MnSO ₄	36	mM
KH ₂ PO ₄	1,2	g/l	ZnSO ₄	38	mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,8	g/l	FeSO ₄	25	mM
Na ₂ HPO ₄	0,4	g/l	CoCl ₂	2	mM
Spurenelementlösung	1,0	ml/l	CuSO ₄		variabel
pH 3,5			H ₃ BO ₃	10	mM
			EDTA	17	mM

Das Standardanzuchtsmedium enthielt 250 µM CuSO₄. In Kupferlimitierungsversuchen wurde eine Spurenelementlösung ohne Kupfer, mit wenig Kupfer (0,04 mM) oder mit viel Kupfer (250 mM) verwendet. Die Endkonzentration an Kupfer betrug dementsprechend 0,04 µM oder 250 µM. Die niedrige Konzentration wurde ebenfalls verwendet, wenn gleichzeitig die Melaninsynthese gehemmt wurde. Um die völlige Abwesenheit von Kupfer zu gewährleisten, konnte das im Medium enthaltene Trypton durch KNO₃ ersetzt werden. Dieses Minimalmedium wurde ebenfalls für die Herstellung von ABTS-haltigen Agarplatten verwendet.

Zur Inhibierung der Melaninsynthese wurde Ascorbinsäure zum Flüssigmedium gegeben. Es wurde eine 10 %ige Ascorbinsäure-Lösung in Aqua demin. angesetzt und sterilfiltriert. Je nach gewünschter Ascorbinsäurekonzentration in den Anzuchtkolben wurden 1-2 ml/l der Lösung dem Medium hinzugefügt.

Medien zur Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

Das LB-Komplexmedium wurde in der unten beschriebenen Form mit 0,5 % NaCl für die Anzucht und die Stammhaltung von *E. coli* verwendet. Zur Selektion von plasmidtragenden Zellen wurde Ampicillin (Amp) in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt (Stammlösung: 1 mg/ml). Zur Selektion von F'-Episom-tragenden Zellen wurde Tetracyclin in einer Konzentration von 12,5 µg/ml eingesetzt (Stammlösung: 12,5 mg/ml in Ethanol).

LB-Komplexmedium (Luria-Bertani-Medium nach Miller, 1972)

Trypton	10,0	g/l
Hefeextrakt	5,0	g/l
NaCl	5,0	g/l
Agar	20,0	g/l
pH 7,5		

Medien zur Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Die Anzucht von *E. coli* für die Herstellung von kompetenten Zellen erfolgte auf SOB-Medium.

SOB-Medium (nach Inoue *et al.*, 1990)

Trypton	20,0	g/l
Hefeextrakt	5,0	g/l
NaCl	0,5	g/l
KCl	2,5	mM
pH 7,0		

2.4 Puffer und Lösungen

Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x):	242 g/l Tris-HCl; 57,1 ml/l Eisessig; 100 ml/l 0,5 M EDTA (pH 8)
Ladepuffer (6x):	0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylen Cyanol FF; 50 % Glyzerin; 12 % 50x TAE-Puffer

Isolierung genomischer DNA und Plasmid-DNA

DNA-Extraktionspuffer:	200 mM Tris-HCl pH 8,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % SDS
TSN-Lösung:	2 % Triton X-100; 1 % SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris (pH 8); 1 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA
Lösung 1:	25 mM Tris-HCl pH 7,9; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA/NaOH pH 8,0
Lösung 2:	0,2 M NaOH; 1 % SDS
Lösung 3:	3 M Kaliumacetat, pH 4,8

Southern Blot

Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Neutralisationslösung:	0,5 M Tris, pH 7,5; 1,5 M NaCl
20x SSC:	3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
Maleinsäurepuffer:	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl, pH 7,5
Waschpuffer:	0,3 % (v/v) Tween 20 pro Liter Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer:	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, pH 9,5

Fotometrischer Nachweis der Laccaseaktivität mit ABTS

Für den Enzymtest zum Laccasenachweis wurde Citrat-Phosphat-Puffer bestehend aus Zitronensäure und Dinatriumhydrogenphosphat nach McIlvaine (1921) verwendet. Für einen Liter Puffer mit einem pH-Wert von 2,6 ergibt sich ein Mischverhältnis von 891 ml 0,1 M Zitronensäure und 109 ml 0,2 M Na₂HPO₄.

Proteinbestimmung mittels Bradford-Test

Das Bradford-Reagenz enthielt 100 mg/l Coomassie Brilliant Blue G250 (in 50 ml 95 % Ethanol) und 100 ml/l Phosphorsäure (85 %).

Transformation von Bakterien

TB-Puffer: 10 mM Pipes; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; pH 6,7 (mit KOH); 55 mM MnCl₂

2M Mg²⁺: 1 M MgCl₂; 1 M MgSO₄

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert.

Proteinbiochemische Methoden

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Gelpuffer: 3 M Tris-HCl, pH 8,45; 0,3 % SDS

Anodenpuffer: 200 mM Tris, pH 8,9

Kathodenpuffer: 100 mM Tris; 0,1 % SDS; 0,1 M Tricin

Western Blot

Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 150 mM Glycin; 20 % Ethanol

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄*7H₂O; 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,3

TBS: 20 mM Tris-HCl; 140 mM NaCl, pH 7,5

TBST: TBS mit 0,1 % Tween-20 (v/v)

Blockierungsreagenz: PBS mit 5 % Magermilchpulver

Antikörper-Reagenz: TBST mit 1 % Magermilchpulver

RNA-Isolierung

LETS-Puffer: 0,1 M LiCl; 0,01 M EDTA; 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,02 % SDS

Saures P/C: Saures Phenol/Chloroform (1:1)

Saures P/C/S: Saures P/C; 1 % SDS

Trizol-Reagenz:	38 % Phenol; 0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M Natriumacetat pH 5,0 ; 5 % Glycerin
DNase-Reaktionspuffer (10x):	400 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM MgSO ₄ ; 10 mM CaCl ₂
DNase-Stop-Lösung:	20 mM EGTA, pH 8,0
NBC-Puffer (20x):	1 M Borsäure; 20 mM Natriumcitrat; pH 7,0

2.5 Kultivierungsverfahren

2.5.1 Stammhaltung und Anzucht von Pilzen

Die Stammhaltung von *H. acidophila* erfolgte auf PDA-Festmedium oder auf Agarplatten mit Anzuchtsmedium. Die Platten wurden bei 25 °C angezogen und in regelmäßigen Abständen überimpft. Ebenfalls regelmäßig wurden frische Glycerinkulturen auf Platten ausgestrichen, um auszuschließen, dass der Pilz durch Mutation seine Eigenschaften verändert. Die Anzucht erfolgte in Erlenmeyer- oder Rundkolben mit Flüssiganzuchtsmedium (2.3.1) bei 25 °C und 150 U/min auf einem Schüttler (Certomat) der Firma B. Braun, Melsungen/Deutschland. Das Inokulum stammte von einer PDA-Platte und wurde in 1 ml Aqua demin. resuspendiert. Für Versuche zur Schutzwirkung von Melanin wurde die Melaninsynthese mit 0,1 % bzw. 0,2 % Ascorbinsäure im Flüssigmedium gehemmt. Um verschiedene Stressfaktoren bei der Anzucht zu untersuchen, wurde entweder die Kupferkonzentration im Medium herabgesetzt, ein höherer pH-Wert eingestellt, oder die Kultur mit Alufolie vor dem Einfluss von Licht geschützt. Für die Anzucht unter Kupferlimitierungsbedingungen wurde Anzuchtsmedium ohne oder mit wenig (0,04 µM) Kupfer verwendet.

2.5.2 Stammhaltung und Anzucht von Bakterien

Stammkulturen von *E. coli* wurden bis zu vier Wochen auf LB-Festmedium gelagert. Eine längere Lagerung war nicht möglich, da es auf Grund des fehlenden Puffers im Medium zu einer starken Ansäuerung des Mediums durch Gärungsprozesse der Bakterien kommen kann. Kulturen wurden nur so lange auf Platten gelagert, bis die Identität der enthaltenen Plasmide geklärt war. Anschließend wurden die Plasmide isoliert und der *E. coli*-Stamm entsorgt. Stammkulturen wurden regelmäßig überimpft. Zur Stabilisierung der Plasmid tragender Stämme enthielt das Medium Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml. Die Stämme XL1-Blue und XL1-Blue MRF' wurden auf LB-Agarplatten mit 12,5 µg/ml Tetracyclin angezogen, um die Anwesenheit des F'-Episoms zu garantieren, auf dem neben dem Gen für

die Tetracyclinresistenz ein Teil des zur Blau-Weiß-Selektion benötigten *lacZ*-Gens liegt. Die Agarplatten wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Die Bakterienanzucht erfolgte im Thermoschüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 200 U/min und einer Temperatur von 37 °C. Beimpft wurde von einer Agarplatte. Die Anzucht erfolgte in sterilen 13 ml-Röhrchen der Firma Sarstedt (Nümbrecht/Deutschland). Für den Selektionsversuch von Laccasegen tragenden Bakterien mittels ABTS-Platten wurden die gleichen ABTS-Platten verwendet wie zur Anzucht von *H. acidophila*. Die Anzucht auf diesen Platten erfolgte bei 37 °C über mehrere Tage, bis ein Wachstum zu erkennen war.

2.5.3 Wachstumsversuche mit *H. acidophila*

Zur Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Laccase-Aktivität in *H. acidophila* wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Dazu wurden 1.000 ml-Rundkolben mit 200 ml Anzuchtmedium mit 250 µM CuSO₄ verwendet. Inokuliert wurde mit Zellmaterial von einer PDA-Platte, welches in 1 ml Aqua demin. resuspendiert wurde. Die Anzucht erfolgte bei 25 °C und 150 U/min (Certomat, Firma B. Braun, Melsungen/Deutschland). Für die Aktivitätsmessung wurde steril 1 ml Kultur, für die Trockengewichtsbestimmung 2 ml Kultur entnommen.

2.5.4 Herstellung von Glyzerinkulturen

Zur Herstellung von Glyzerinkulturen von *E. coli* wurden die entsprechenden Bakterienkulturen über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit oder ohne Antibiotikum angezogen. Eine 20 ml-Hauptkultur wurde am nächsten Tag beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von über 1 angezogen. Anschließend wurde ein Glycerin-LB-Gemisch (1:1) im Verhältnis 1:1 zu der Kultur gegeben, so dass der Glyzeringehalt bei 25 % lag. Um Glyzerinkulturen von *H. acidophila* herzustellen, wurde der Pilz auf PDA-Platten angezogen. Es wurde eine Zellsuspension von $1,8 \cdot 10^9$ Zellen/ml in sterilem 17 %igen Glycerin hergestellt. Aliquots aller Glyzerinkulturen von 1 ml wurden bei -80 °C eingefroren. Nach einigen Tagen wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch Ausstreichen auf Festmedium überprüft.

2.6 Aktivitätsbestimmung der Laccase

Die Bestimmung der Enzymaktivität der Laccase erfolgte fotometrisch. Um die erhaltenen Aktivitätswerte vergleichbar zu machen, wurden die Werte zum Proteingehalt der Probe in Beziehung gesetzt oder mit dem Trockengewicht der Kultur verglichen.

2.6.1 Fotometrische Aktivitätsbestimmung mit ABTS

Für die fotometrische Aktivitätsbestimmung wurde das künstliche Laccasesubstrat ABTS verwendet (Abb. 5). Die Substanz ist im reduzierten Zustand ein farbloses Salz und absorbiert im oxidierten Zustand u. a. bei 420 nm. Diese Absorption wurde in einem Ultraspec 2000-Fotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge/England) gemessen. Da oxidative Aktivität gemessen wird, erfasst der Test auch Oxidasen, die keine Laccasen sind.

Die Messung der Laccaseaktivität erfolgte sowohl im Überstand als auch an ganzen Zellen. Es wurde 1 ml der wachsenden Kultur abgenommen und 5 min bei 18.600 g abzentrifugiert (4 °C, Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg). Der Überstand wurde abgenommen und vermessen. Dazu wurden 200 µl Probe mit 700 µl Citrat-Phosphat-Puffer gemischt und als Referenz verwendet. Zehn Minuten nach Zugabe von 100 µl 3 mM ABTS-Lösung wurde die Absorption bei 420 nm gemessen. Zur Bestimmung der Laccaseaktivität an ganzen Zellen wurde das Zellpellet in 1350 µl Citrat-Phosphat-Puffer resuspendiert und mit 150 µl 3 mM ABTS-Lösung versetzt. Der Ansatz inkubierte unter Rühren auf einem Magnetrührer in einem offenen 2 ml-Reaktionsgefäß für 1-5 min. Das offene Reaktionsgefäß gewährleistete eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Laccase, die O₂ als terminalen Elektronenakzeptor verwendet. Die Reaktion wurde durch 1minütiges Abzentrifugieren bei 18.600 g (4 °C) beendet. Ein Milliliter des Überstandes wurde im Fotometer bei 420 nm vermessen. Als Referenz diente hierbei ein Ansatz aus 900 µl Citratpuffer und 100 µl ABTS.

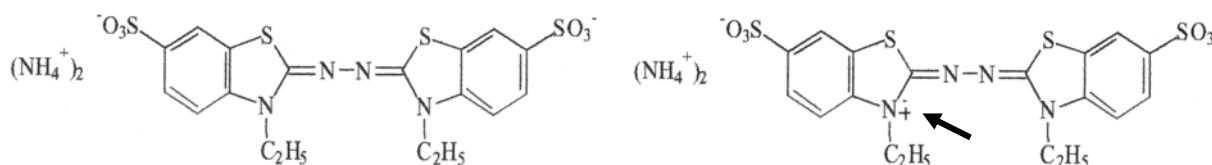


Abb. 5: ABTS und ABTS-Monoradikalkation. Bei der Oxidation von ABTS durch die Laccase entsteht ein Kation (Pfeil), welches grün erscheint. Bei der weiteren Oxidation zu ABTS²⁺ entsteht ein violetter Farbton.

2.6.2 Berechnung der Enzymaktivität

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte an Hand der angegebenen Formel. Angegeben wurde die Aktivität in der Einheit U, definiert als µmol Substratumsatz pro Minute. Die Werte beziehen sich auf 1 ml Überstand bzw. 1 ml Zellsuspension bei der Messung an ganzen Zellen.

$$\text{Aktivität} = \Delta c / \Delta t = \Delta A / (\Delta t \cdot \epsilon \cdot d) \cdot V_{\text{Gesamt}} / V_{\text{Probe}}$$

$$\text{Einheiten: } U/\text{ml} = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$\epsilon = 36,1 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol} \text{ (für ABTS bei 420 nm)}$$

2.6.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde durchgeführt, um die Enzymaktivität im Überstand mit einem Proteingehalt korrelieren zu können. Da im Überstand relativ wenige Proteine vorliegen, sollte der Proteingehalt näherungsweise gleich dem Laccasegehalt sein. Die Aktivitätswerte an ganzen Zellen konnten nur auf 1 ml Zellsuspension bezogen werden, da eine Proteinbestimmung der Gesamtzellproteine keinen Aufschluss über die Proteinkonzentration der Laccase gibt. Über die Bestimmung des Trockengewichts kann hier eine bessere Vergleichbarkeit der Aktivitätswerte erzielt werden.

Es erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford (1976). Bei dieser Methode bindet der verwendete Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an das Protein, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm führt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann fotometrisch gemessen werden. Hierzu wurden 100 µl Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und für 10 min inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm mit Aqua demin. als Referenz in einem Ultraspec 2000-Fotometer (Firma Pharmacia Biotech, Cambridge/England). Die Eichgerade wurde mit einer geeigneten Konzentration an Bovinem Serum Albumin (BSA) erstellt.

2.6.4 Trockengewichtsbestimmung

Die Trockengewichtsbestimmung erfolgte, um das Wachstum des Pilzes zu quantifizieren. Eine Messung der optischen Dichte als Maß des Pilzwachstums war auf Grund der starken Melaninbildung, welche die Messung beeinflusste, nicht möglich.

Eine bestimmte Menge Zellsuspension wurde abzentrifugiert (18.600 g, 5 min, Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg) und 2x mit Aqua demin. gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Aqua demin. resuspendiert und in ein zuvor gewogenes Reagenzglas gegeben. Das Reagenzglas wurde über Nacht bei 100° C in einem Trockenschrank getrocknet und anschließend erneut gewogen. Bei dem Versuch zur Schutzwirkung des Melanins wurden auf Grund der geringen Trockengewichtswerte die gesamten 50 ml-Zellsuspension abzentrifugiert und anschließend in 1 ml Aqua demin. aufgenommen.

2.7 Immunologischer Nachweis der Laccase

Um die Laccasen auf Proteinebene nachzuweisen, wurde ein Western Blot mit anschließender immunologischer Markierung durchgeführt. Verwendet wurden polyklonale Antikörper gegen

die aufgereinigten Laccasen von *Ceriporiopsis subvermispora* (Ruel *et al.*, 1998) und *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen & Saloheimo, 2004).

2.7.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen auf Grund ihrer Größe und Ladung. Dabei wandern die Proteine im elektrischen Feld durch die Maschen des Polyacrylamids, deren Größe durch den Vernetzungsgrad vorgegeben ist. Des Weiteren wird die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Eigenladung des Proteins und seine Tertiärstruktur beeinflusst. Um diese Einflüsse zu minimieren, kann die PAGE unter denaturierenden und bei Bedarf reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden. Dieses Verfahren wurde 1970 von Laemmli entwickelt und trägt den Namen SDS-PAGE. Die so genannte diskontinuierliche SDS-PAGE bietet zudem die Möglichkeit, die einzelnen Banden sehr scharf zu fokussieren.

Die SDS-PAGE verwendet SDS, um die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld auf das Molekulargewicht zu begrenzen. Mit seiner hydrophoben Gruppe lagert sich SDS an die hydrophoben Gruppen der Proteine und verringert die stabilisierenden Wechselwirkungen, so dass sich das Protein entfaltet. Zusätzlich führt SDS viele negative Ladungen in das Protein ein und überlagert dadurch Eigenladungen der Aminosäuren. Da die Menge der eingeführten Ladung normalerweise direkt proportional zur Molekülmasse ist (je 1 Molekül SDS bindet an 2 Aminosäuren), lässt sich ein Protein an Hand seiner Laufstrecke im Gel einem Molekulargewicht zuordnen. Man spricht allerdings von dem apparenten Molekulargewicht, da sich Proteine in einigen Fällen nicht ihrem Molekulargewicht gemäß auftrennen lassen. Ein weiteres Problem stellen Disulfidbrücken dar, die jedoch durch Einsatz von Reduktionsmitteln wie z. B. β -Mercaptoethanol oder DTT beseitigt werden können. Eine weitere Verfeinerung der Methode stellt die diskontinuierliche SDS-PAGE dar. Hierbei wird das SDS-Protein zuerst in einem Sammelgel in einem Bereich hoher Feldstärke konzentriert. In dem anschließenden Trenngel werden die SDS-Proteine auf Grund der höheren Acrylamidkonzentration zurückgehalten und trennen sich gemäß ihrer Molekulargewichte. Es wurden Tricin-SDS-Gele (Schägger & Jagov, 1987) verwendet, da diese große Proteine besser auftrennen als die SDS-Gele nach Laemmli.

Vorbereitung der Gele

Die Gele bestehen aus Acrylamidmolekülen, die nach Kontakt mit dem Radikalbildner, Ammoniumpersulfat (APS) eine radikalische Polymerisation durchführen und somit lange Ketten bilden. Die Substanz Temed dient bei dieser Reaktion als Katalysator. Um eine

Quervernetzung der Polyacrylamidketten zu ermöglichen, wird N,N'-Methylen-Bisacrylamid zugesetzt, so dass eine Quervernetzung der Ketten über die Methylengruppen stattfinden kann. Die Porengröße wird sowohl vom Gesamtgehalt an Acrylamid und Bisacrylamid (% T) als auch vom Anteil des Quervernetzers am Gesamtgehalt (% C) bestimmt. Zur Herstellung der Gele wurden Rotiphorese-Lösung A (30 % Acrylamid) und B (2 % Bisacrylamid) der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) verwendet (Tab. 6).

Tab. 6: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Trenngel (T = 11,5 %)		Sammelgel (T = 3 %)	
Trenngelpuffer	3,35 ml	Sammelgelpuffer	1,600 ml
Rotiphorese A	3,20 ml	Rotiphorese A	0,900 ml
Rotiphorese B	1,50 ml	Rotiphorese B	0,375 ml
Aqua demin.	1,80 ml	Aqua demin.	5,600 ml
Glyzerin	1,15 ml	Glyzerin	/
zur Polymerisation			
10 % APS	50,0 µl	10 % APS	75 µl
Temed	6,3 µl	Temed	20 µl

Vorbereitung der Proben

Die Proben wurden von Dipl.-Biol. Jutta Bend bereitgestellt. Es handelte sich um konzentrierten Kulturüberstand und um Zellaufschlussproben. Die Zellen wurden mit einer modifizierten DNA-Isolierungsmethode aufgeschlossen, um die Laccase zu isolieren (Bend, 2005). Die Proben wurden vor dem Auftragen in Rotiload-Probenpuffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gelöst. Dieser Puffer enthält 4 % (w/v) SDS, 12 % (w/v) Glyzerin, 50 mM Tris- HCl-Puffer pH 6,8 sowie DTT als reduzierendes Agens und Serva Blue G als Farbstoff. Als Größenstandard diente die Prestained Protein Ladder der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

Durchführung der Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in einer Mini-PROTEAN II Elektrophoresekammer der Firma Bio-Rad (Hercules, CA/USA) durchgeführt. Als Spannungsquelle diente der Power Pac 200 ebenfalls von der Firma Bio-Rad. Der Einlauf der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 100 V, beim Übergang ins Trenngel wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nach der Gelelektrophorese erfolgte ein Western Blot.

2.7.2 Western Blot

Der Western Blot besteht aus dem Western Transfer, der Immunohybridisierung und einem kolorimetrischen Nachweis. Die gesamten Proteine werden nach der SDS-PAGE durch Stromfluss auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anschließend durch einen Antikörper, der spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet, selektiv markiert. Im nächsten Schritt wird der sekundäre Antikörper hinzugegeben, der wiederum an den ersten Antikörper bindet, und an den ein Enzym wie z. B. die Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Mit geeigneten Nachweisreagenzien kann die Lokalisation dieses Antikörper-AP-Konjugats sichtbar gemacht werden, da das Enzym die im Nachweisreagenz enthaltenen Substrate zu einem Farbstoff umsetzt. Gegenüber der unspezifischen Coomassie-Färbung, die alle Proteine durch Bindung des Farbstoffes färbt, hat der Western Blot den Vorteil, dass durch die verwendeten Antikörper der spezifische Nachweis eines bestimmten Proteins oder zumindest einer Proteinklasse erfolgen kann. Die Spezifität des Verfahrens hängt von Art und Qualität des zur Verfügung stehenden Antikörpers ab.

Western Transfer

Der Western Transfer erfolgte mit der Mini-Trans-Blot-Electrophoresis-Transferkammer der Firma Bio-Rad (Hercules, CA/USA) in einem Feuchtblot-Verfahren. Der Aufbau des Blots erfolgte in einer mit Transferpuffer getränkten Schale, wie in Abbildung 6 beschrieben. Als Membran wurde eine Nitrocellulosemembran mit Porengröße 0,2 µm verwendet (Schleicher & Schuell, Dassel). Die Blotkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und das Gel 1 h 15 min bei 100 V und 4 °C geblottet. Die Proteine wandern im Stromfluss auf Grund ihrer negativen Ladung zur Anode und bleiben auf der Nitrocellulosemembran hängen.

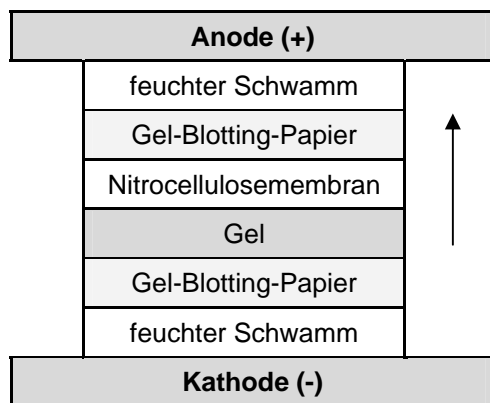


Abb. 6: Aufbau des Elektroblot-Geräts. Die SDS-Proteine wandern vom Minuspol zum Pluspol und binden an die Nitrocellulosemembran.

2.7.3 Immunologische Hybridisierung und kolorimetrische Detektion

Für den immunologischen Nachweis wurden polyklonale Primärantikörper aus Kaninchen verwendet (siehe 2.7). Als Sekundärantikörper wurde ein AP-Konjugat eines Anti-Kaninchen-Antikörpers (IgG-Fc, Promega) gewählt.

Immunohybridisierung

Die Membran wurde über Nacht auf einem Schüttler in Blockierungsreagenz inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren, da die Antikörper sonst unspezifisch an die Membran binden und ein Hintergrundsignal erzeugen würden. Zudem ist wichtig, dass die Seite der Membran, die Kontakt mit dem Gel hatte und die Proteine trägt, bei allen folgenden Schritten nach oben zeigt. Nach erfolgter Blockierung wurde die Membran 3x 10 min mit TBST gewaschen. Der Primärantikörper wurde 1 : 2000 verdünnt in Antikörper-Reagenz eingesetzt und für 1 h auf die Membran gegeben. Nach dem Abgießen der Antikörperlösung wurde erneut 3x 10 min mit TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde nach diesen Waschschritten 1:2000 in Antikörper-Reagenz verdünnt und ebenfalls für 1 h auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran 5x 10 min mit TBST gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschriffe erfolgten bei RT (Raumtemperatur) und gleichmäßigem Schütteln.

Kolorimetrischer Nachweis

Zum Nachweis der Alkalischen Phosphatase (AP) wurde eine BCIP/NBT-Fertiglösung (Sigma, St. Louis, MO/USA) eingesetzt. BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat) dient als AP-Substrat (Horwitz *et al.*, 1966), das nach seiner Dephosphorylierung oxidativ in einen blauen, wasserunlöslichen Indigofarbstoff überführt wird. Als Oxidationsmittel dient NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid), welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reagiert und somit farbverstärkend wirkt (Michal, 1983). Die BCIP/NBT-Fertiglösung enthielt 0,48 mM NBT und 0,56 mM BCIP. Die Membran wurde in ein sauberes Gefäß gegeben und 1-15 min mit dem Farbreagenz inkubiert, bis eine Farbsättigung eintrat. Anschließend wurde die Membran in Aqua demin. gewaschen und getrocknet.

2.8 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.8.1 Isolierung von genomischer DNA aus Pilzen

Die Isolierung von genomischer DNA aus schwarzen Hefen ist auf Grund der stark melanierten Zellwand schwieriger als z. B. bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Gleichzeitig ist der Zellaufschluss mit Hilfe von Flüssigstickstoff schwieriger als bei filamentösen Pilzen, da sich einzelne Hefezellen nicht abfiltrieren lassen. Aus diesem Grund wurden drei verschiedene Methoden zur Isolierung von genomischer DNA aus *H. acidophila* ausprobiert. Es wurde ein Kit zur Isolierung von genomischer DNA aus Pilzen (FASTDNA-Kit) verwendet, eine Methode zur Isolierung genomischer DNA aus nicht-melanisierten Hefen (Hoffmann & Winston, 1987) und eine Methode zur DNA-Extraktion aus filamentösen Pilzen (Raeder & Broda, 1988).

Isolierung genomischer DNA mit dem FASTDNA-Kit

Das FASTDNA-Kit der Firma Qbiogene (Carlsbad/CA, USA) ist optimiert für die schnelle Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen, Pilzen oder tierischen Zellen. Die Zellen werden zusammen mit einer speziellen Matrix (Kugeln unterschiedlichen Durchmessers) und einem für die gewünschte Organismengruppe spezifischen Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wird in einem FastPrep-Instrument (Firma Eubio, Wien/Österreich) dreidimensional geschüttelt. Hierdurch soll ein Aufschluss der Zellen erfolgen.

Für die Isolierung von genomischer DNA wurden 2 ml einer 10 Tage alten *H. acidophila*-Kultur abgeerntet (5 min bei 18.600 g, Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg). Der Überstand wurde entfernt und 100 mg des Pellets wurden mit der Matrix und 1 ml des Hefespezifischen Puffers CLS-Y vermischt. Dieser Puffer ist wie die anderen bei dieser Methode verwendeten Puffer Bestandteil des Kits. Die Homogenisierung erfolgte im FastPrep-Instrument 2x 30 s bei einer Stärke von 5,0. Zwischen den Rotationsdurchgängen erfolgte eine 2minütige Inkubation auf Eis, um eine Überhitzung der Probe zu vermeiden. Anschließend erfolgte eine 15minütige Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C. Der DNA-haltige Überstand (600 µl) wurde abgenommen und mit 600 µl Bindematrix für 5 min bei RT inkubiert. Die Matrix wurde für 1 min bei 14.000 g und 4 °C abzentrifugiert und in 500 µl des Puffers SEWS-M resuspendiert. Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand durch zweimaliges Zentrifugieren (1 min, 14.000 g, 4 °C) vollständig entfernt. Die Elution der DNA erfolgte durch Resuspension der Matrix in 100 µl DES-Puffer und 3minütiger Inkubation. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 14.000 g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

Isolierung genomischer DNA aus filamentösen Pilzen (Raeder & Broda, 1988)

Für den Zellaufschluss wurden 200 ml *H. acidophila*-Kultur abgeerntet (15 min, 17.000 g, Sorvall RC2-B Automatic Refrigerated Centrifuge, GSA-Rotor, Firma Du Pont de Nemours,

Bad Homburg/Deutschland). Das Zellpellet wurde mit Flüssigstickstoff tiefgefroren und zermörsert. Etwa 400 mg des Zellmaterials wurde abgewogen und in 700 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die DNA-Isolierung erfolgte durch Zugabe von 500 µl Phenol (pH 7,5) und kräftiges Mischen mit einem REAX 2000 Mischgerät (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach). Nach dem Abzentrifugieren (15 min, 14.000 g, 4 °C, Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg) konnten circa 700 µl Überstand abgenommen werden. Um die im Überstand enthaltene RNA abzubauen, wurden 20 µl RNase A zugegeben (10 mg/ml). Die Inkubation erfolgte 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden 700 µl Chloroform zugeben und 10 min bei 14.000 g zentrifugiert (4 °C). Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte 2 h bei -20 °C. Anschließend wurde 30 min bei 14.000 g zentrifugiert (4 °C). Das DNA-Pellet wurde 2x mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 4 °C, 14000 g) und circa 2 min an der Luft getrocknet, bevor es in 50 µl Reinstwasser aufgenommen wurde.

Isolierung genomischer DNA aus Hefen (Hoffmann & Winston, 1987)

Drei Milliliter einer *H. acidophila*-Kultur wurden abgeerntet (5 min, 4 °C, 14.000 g, Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg) und in 200 µl TSN-Lösung resuspendiert. Es wurden etwa 250 mg Glaskügelchen (Durchmesser 0,4-0,6 mm) und 200 µl neutrales Phenol-Chloroform zugegeben. Die Kügelchen wurden zuvor 1 h in konzentrierter Salpetersäure gerührt und durch Waschen wieder auf neutralen pH-Wert gebracht. Für den Zellaufschluss wurde entweder für 2-3 min auf einem Mischgerät gemischt (REAX 2000 Mischgerät, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach) oder der FastPrep Ribolyser (Stärke 4,0; 20-30 sec, Firma Eubio, Wien/Österreich) verwendet. Anschließend wurde für 5-10 min bei RT zentrifugiert (14.000 g) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer resuspendiert und für die Nachextraktion kurz mit Hilfe des Mischgeräts gemischt. Nach erneuter Zentrifugation (5-10 min bei RT, 14000 g) wurde der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Die Überstände wurden mit 4 µl RNase A (10 mg/ml) 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl Phenol-Chloroform zugegeben, vorsichtig vermischt und zentrifugiert (5-10 min, 14.000 g, 4 °C), so dass der wässrige Überstand abgenommen werden konnte. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 4 µl 5 M NaCl und 1 ml Ethanol. Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurde die DNA 30 min bei 14.000 g (4 °C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde 2x mit 1ml 70 % Ethanol gewaschen und in 30-50 µl TE-Puffer oder Reinstwasser resuspendiert. Genomische DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde ein Plasmidisolierungskit (QIAprep Miniprep) der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Angewandt wurde hierbei das Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Reneutralisierung (Birnboim & Doly, 1979). Die Bakterien wurden unter Zugabe von NaOH und SDS lysiert, wobei sowohl DNA als auch Proteine denaturierten. Die anschließende Zugabe eines acetathaltigen Puffers führte zur Renaturierung der kleinen und kompakten Plasmid-DNA, die deshalb in Lösung verblieb, während genomische DNA und Proteine mit Salzen präzipitierten und durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Die Gewinnung der Plasmid-DNA aus der wässrigen Lösung erfolgte durch spezifische Anbindung an eine Silicagelmembran unter Zugabe von caotropen Salzen (Vogelstein & Gillespie, 1979). Die Verwendung eines niedersalinen Puffers führte daraufhin zur Elution der Plasmid-DNA.

Sollten Plasmide isoliert werden, ohne dass ein hoher Reinheitsgrad erforderlich war, wurde eine Schnellisolierung nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Hierzu wurden 1-3 ml Zellkultur abgeerntet (5 min, 13.000 g, Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg) und das Pellet in 50 µl Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden 60 µl Lösung 2 zugegeben, vorsichtig vermischt und 1-3 min inkubiert. Nach dem erfolgten Zellaufschluss wurden zur Neutralisation 75 µl Lösung 3 zugegeben und erneut vorsichtig gemischt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13.000 g (4 °C) wurde der Plasmid-DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Es wurde 2 min bei 13.000 g (4 °C) zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl 70 %igen Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.8.3 Isolierung von RNA

RNA wurde mit zwei verschiedenen Methoden extrahiert. Bei einer Methode wurde spezifisch mRNA über den PolyA-Schwanz isoliert, den nur diese RNA trägt, bei der anderen wurde die gesamte RNA isoliert, welche anschließend komplett in die PCR zur cDNA-Synthese eingesetzt werden konnte.

2.8.3.1 Isolierung von mRNA mittels Dynabeads ®

Da für die Expressionsanalyse des Laccasegens und dessen cDNA-Synthese nur die mRNA wichtig ist, wurde ein Kit verwendet, mit welchem die Isolierung reiner mRNA möglich sein soll. Dieses Kit (Dynal von Dynal A.S., Oslo, Norwegen) macht sich die Tatsache zu Nutze, dass Transkripte am 3'-Ende eine Abfolge von Adeninresten besitzen (PolyA-Schwanz). Darüber bindet die mRNA an magnetische Kügelchen (Dynabeads), welche einen

Poly-Thymidinrest tragen und wiederum durch einen Magneten (Dynal MPC) gesammelt werden können. Zentrifugationsschritte entfallen bei diesem Verfahren. Alle verwendeten Puffer waren Bestandteil des Kits.

Der Zellaufschluss erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben durch Zermörsern der Zellen nach Schockgefrierung mittels Flüssigstickstoff. Hundert Milligramm der tiefgefrorenen Zellen wurden in 1 ml Lysis-/Bindepuffer resuspendiert und 1 min bei 14.000 g (4 °C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde zu 250 µl Dynabeads gegeben, welche zuvor in Lysis/Bindepuffer gewaschen worden waren. Um die Bindung der mRNA an die Dynabeads zu ermöglichen, wurde das Reaktionsgefäß 5 min bei RT geschüttelt. Im Dynal MPC wurden die Kügelchen gesammelt, so dass der Überstand abgenommen werden konnte. Anschließend wurde zweimal mit Waschpuffer A und einmal mit Waschpuffer B gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgte durch Zugabe von 20 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer und 2minütiges Erhitzen auf 65-80 °C. Der Überstand wurde nach diesem Inkubationsschritt vorsichtig im Dynal MPC abgenommen. Die mRNA wurde, wenn möglich, sofort in cDNA umgeschrieben. War dies nicht möglich, wurde sie bei -80 °C gelagert.

2.8.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Bei der Isolierung von Gesamt-RNA erhält man normalerweise ausreichend mRNA, um eine cDNA-Synthese durchführen zu können. Da herkömmliche Aufschlussmethoden unter Verwendung von Bindematrizes zur Isolierung von Nukleinsäuren bereits bei der DNA-Isolierung versagt hatten, wurde eine Isolierungsmethode gewählt, die analog zu der Methode von Hoffmann & Winston (1987) mit Glaskügelchen arbeitet. Durch die Wahl der Puffer und der Verwendung von saurem statt neutralem Phenol sollte dabei jedoch RNA statt DNA isoliert werden. Insgesamt wurden drei verschiedene Extraktionsmethoden ausprobiert.

Zellaufschluss und RNA-Isolierung aus Hefen (Heiland, 1999)

Von einer 4-6 Tage alten Flüssigkultur wurden 20 ml für 5 min bei 1.500 g und 4 °C (Biofuge 22R, Heraeus Sepatech, Osterode) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem Reinstwasser resuspendiert und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach erneuter 5minütiger Zentrifugation wurde das Pellet in 500 µl LETS-Buffer resuspendiert. Es wurden etwa 0,75 g sauer gewaschene Glasperlen und 0,5 ml saures P/C/S zugegeben und 2 min gemischt (REAX 2000 Mischgerät, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach). Dabei wurden die Proben alle 30 s auf Eis gekühlt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg) wurde der Überstand abgenommen und mit dem

gleichem Volumen saurem P/C versetzt. Die Probe wurde 1 min kräftig geschüttelt und erneut für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Diese Extraktion wurde 2-3x wiederholt bis keine deutliche Interphase mehr zu sehen war.

Anschließend wurde der Überstand mit 1/20 Volumen 40 % Kaliumacetat (pH 5,2) und 2,5-3fachem Volumen Ethanol gefällt. Die Fällung erfolgte 15 min auf Eis. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C wurde das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und in 42 µl Reinstwasser aufgenommen. Alternativ wurde statt dem P/C/S-Gemisch und dem P/C-Gemisch ein P/C/I-Gemisch (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 50:49:1) der Firma Carl Roth GmbH verwendet.

Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol-Reagenz

Von einer 4-6 Tage alten Flüssigkultur wurden 4 ml für 5 min bei 1.500 g und 4 °C (Biofuge 22R, Heraeus Sepatech, Osterode) abzentrifugiert. Das Pellet wurde nicht gewaschen, da dies die Degradation der RNA fördern kann. Es wurden zwei alternative Isolierungsmethoden unter Verwendung des Trizol-Reagenzes ausprobiert. Diese Methoden werden von kommerziellen Herstellern des Trizol-Reagenzes vorgeschlagen.

1. Methode

Die Zellen wurden in 1 ml Trizol-Reagenz resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden ca. 0,75 g sauer gewaschene Glasperlen zugegeben und 1 min gemischt (REAX 2000 Mischgerät, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach). Es wurden 200 µl Chloroform zugefügt, 30 s geschüttelt und erneut für 3 min bei RT inkubiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C (Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg) wurde der Überstand abgenommen und mit 2/3 Volumen Isopropanol versetzt. Nach 15minütiger Inkubation bei RT wurde erneut für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen und in 42 µl Reinstwasser aufgenommen.

2. Methode

Die Zellen wurden in 1 ml Trizol-Reagenz resuspendiert und für 5 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden etwa 0,75 g sauer gewaschene Glasperlen zugegeben und 1 min gemischt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und mit 200 µl Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde 15 s geschüttelt und für 2-3 min bei RT inkubiert. Es erfolgte eine 15minütige Zentrifugation bei 10.000 g (4 °C). Anschließend wurde der Überstand mit 1/20 Volumen 40 % Kaliumacetat (pH 5,2) und

2,5-3fachem Volumen Ethanol gefällt. Die Fällung erfolgte 15 min auf Eis. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C wurde das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und in 42 µl Reinstwasser aufgenommen.

Entfernung von genomischer DNA

Um Kontaminationen mit genomischer DNA zu verhindern, wurde eine DNase-I-Behandlung durchgeführt. Wahlweise konnte eine Lithiumacetat-Fällung vorgeschaltet werden.

Lithiumacetat-Fällung

Zu der RNA wurde 1 Volumen 5 M Lithiumacetat gegeben. Nach 30 min auf Eis wurde die Probe 20 min bei 14.000 g und RT abzentrifugiert. Bei dieser Fällung enthält das Pellet die RNA, der Überstand die DNA. Das Pellet wurde 2x mit vorgekühltem 70 % Ethanol gewaschen und in 42 µl Reinstwasser aufgenommen.

DNase-I-Behandlung

Die 42 µl RNA wurden mit 1 µl RNase-Inhibitor (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), 1 µl DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 5 µl 10x DNase-Reaktionspuffer versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden 5 µl DNase-Stop-Lösung zugeben. Die Probe wurde kurz auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Reaktion vollständig abzustoppen.

Zur Aufreinigung der RNA wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der Überstand mit 55 µl saurem P/C versetzt und 1 min kräftig geschüttelt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C wurde der Überstand mit 1/20 Volumen 40 % Kaliumacetat (pH 5,2) und 2,5fachem Volumen Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte 15 min auf Eis mit anschließender 30minütigen Zentrifugation bei 14.000 g (4 °C). Das RNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 40 µl Reinstwasser resuspendiert.

Vorsichtsmaßnahmen bei der RNA-Isolierung

Das Reinstwasser für die Resuspension wurde vor der Verwendung mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt, um RNasen zu entfernen. Spitzen und Reaktionsgefäße wurden zweimal autoklaviert und Reaktionsgefäße zusätzlich 2 min mit UV-Licht bestrahlt. Die Arbeitsfläche und Pipetten wurden mehrfach mit Ethanol desinfiziert. Alle Reaktionsschritte wurden – soweit möglich – auf Eis durchgeführt.

2.8.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte fotometrisch im Ultraspec 2000-Fotometer (Firma Pharmacia Biotech, Cambridge/England). Die Absorption erfolgte bei 260 nm zur Quantifizierung der Nukleinsäuren und bei 280 nm zur Ermittlung von Proteinverunreinigungen. Eine Absorption von 1 entsprach dabei 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäuren ergab sich aus dem Quotienten von Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm. Eine optimale Ratio liegt bei 1,8 für reine DNA-Proben, für reine RNA-Proben bei 2,0.

Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung von DNA mit Hilfe eines Agarosegels durch Vergleich mit Proben bekannter DNA-Konzentration. Voraussetzung ist, dass zwei Banden gleicher DNA-Konzentration im mit Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel unter UV-Licht gleich stark fluoreszieren. Zur Quantifizierung wurde die 3.000-bp-Bande des 1-kb-Markers (Gene Ruler™ 1-kb-Leiter, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet, da die in der Bande enthaltene DNA-Menge vom Hersteller angegeben wird. Durch Vergleich der Leuchtintensität der Marker-Bande mit der der Bande der zu untersuchenden DNA konnte die Konzentration letzterer abgeschätzt werden.

2.9 Enzymatische Modifikationen von DNA

Unter enzymatischen Modifikationen von DNA werden verschieden Reaktionen zusammengefasst, die bei Klonierungen eine Rolle spielen (z. B. Restriktionsspaltung, Ligation). Die Beschreibung von Reaktionen, die nur in einem speziellen Kontext verwendet wurden (z. B. Phosphorylierung bei der inversen PCR) werden in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

2.9.1 Restriktionsspaltung und Dephosphorylierung

Derivate des Plasmids pGEM-T Easy wurden zur Überprüfung des Inserts 3 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* bzw. *NotI* (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) hydrolysiert. Die Restriktionsspaltung fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl statt, in dem 2 µl Puffer und 12 U Enzym enthalten waren. Die eingesetzte DNA-Konzentration betrug 0,5-1,5 µg. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte für 20 min bei 65 °C.

Für die Herstellung einer partiellen genomischen DNA-Bank wurde das Plasmid pBlueScript SK (+) mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *EcoRI* (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) für 3h bei 37 °C hydrolysiert. Die Restriktionsspaltung fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl statt, die Konzentration von Plasmid-DNA und Enzymkonzentration variierten zwischen

1-25 µg bzw. 10-20 U. Nach der anschließenden 20minütigen Hitzeinaktivierung wurde 1 µl CIAP (calf intestine alkaline phosphatase, 1 U/µl) zugegeben. Die Dephosphorylierung erfolgte 30 min bei 37 °C und wurde anschließend 15 min bei 85 °C abgestoppt. Das Plasmid pUC18 wurde ebenso behandelt.

Genomische DNA wurde für die inverse PCR, die Durchführung des Southern Blots und für die Herstellung der partiellen genomischen DNA-Bank mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert. Verwendete Restriktionsenzyme stammten von Promega (Madison, WI/USA), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) oder MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot). In einem Gesamtvolumen von 50 µl erfolgte die Restriktionsspaltung von 5-10 µg DNA mit 40 U Enzym für 19 Stunden bei 37 °C. Vor Weiterverarbeitung der hydrolysierten DNA erfolgte eine 20minütige Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C bzw. 80 °C.

2.9.2 Ligation

Die Ligation der PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T Easy erfolgte mit einem gleichnamigen Kit der Firma Promega (Madison/WI, USA). Es erfolgte eine Ligation mit glatten Enden (blunt-end ligation), so dass die PCR-Fragmente vor der Ligation nicht mit Restriktionsenzymen hydrolysiert werden mussten. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl, in denen 5 µl 2x Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (3U/µl), 1 µl Vektor und 0,5-3 µl PCR-Produkt enthalten waren. Die Ligation von Restriktionsfragmenten genomischer DNA in die Plasmide pBlueScript SK (+) und pUC18 erfolgte nach einer Dephosphorylierung des Vektors. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl, in denen 1 µl 10x Puffer, 0,5 µl T4-DNA-Ligase (5U/µl), 25-100 ng Vektor und circa 50 ng aus dem Gel aufgereinigte Restriktionsfragmente enthalten waren. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert angesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

2.9.3 DNA-Konzentrierung und DNA-Aufreinigung

Lag eine geringe DNA-Konzentration vor, so wurde diese mit Hilfe von Microcon-Säulen (Millipore, Bedford/MA, USA) erhöht. Die DNA wurde durch 12minütige Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg) bei 13.600 g an den in den Säulen enthaltenen Filter aus hydrophiler Cellulose (Microcon YM 50) gebunden. Dieser Filter ist für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 50 kDa durchlässig, für doppelsträngige DNA mit mehr als 100 bp jedoch undurchlässig, so dass die Säulen auch zur Aufreinigung von DNA bzw. zur Entfernung von Proteinen verwendet werden können. Der Filter mit der gebundenen DNA wurde umgekehrt auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt, damit die DNA nach Zugabe von

Reinstwasser bei Zentrifugation mit niedriger Umdrehungszahl in das Gefäß eluiert wurde. Das Volumen, in dem die DNA aufgenommen wurde, konnte beliebig gewählt werden. Zur Entfernung von Restriktionsenzymen und der CIAP-Phosphatase vor einer Ligation wurde die DNA 1 min bei 13.600 g durch einen Micropure-Filter (Millipore, Bedford/MA, USA) zentrifugiert. Doppelsträngige DNA-Fragmente einer Größe von 20 bp bis 50 kb passierten den Filter, während Proteine im Filter aufgehalten wurden.

2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Sie erfolgte in einer Hoefer Horizontal-Flachbett-Gelkammer der Firma Amersham Biosciences (San Francisco/CA, USA).

2.10.1 Gelelektrophorese von DNA

Für die Gelelektrophorese von DNA wurde Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst, aufgeköcht und unter Rühren leicht abgekühlt, bevor das Gel gegossen wurde. Die Agarose-Konzentration richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente und lag zwischen 0,8 % und 1,5 %. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer überschichtet und mit den Proben beladen. Diese wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6x Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurden außerdem geeignete Größenmarker aufgetragen (100-bp-Leiter, New England BioLabs Inc., Beverly/MA, USA; 1-kb-Leiter, MBI Fermentas, ST. Leon-Rot). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 65-80 V. Die DNA konnte durch Färbung mit Ethidiumbromid nachgewiesen werden, da Ethidiumbromid in die DNA-Doppelhelix interkaliert und im UV-Licht fluoresziert. Von einer Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml) wurden 6 µl auf 50 ml Agaroselösung gegeben, bevor das Gel gegossen wurde. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde das Gel bei UV-Durchlicht (UV-Transilluminator, Rothhaar und Schroeder) fotografiert.

2.10.2 Gewinnung von DNA aus Agarosegelen

Um ein möglichst sauberes PCR-Produkt in die Ligation einsetzen zu können, wurde der PCR-Ansatz zunächst in einem Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde anschließend bei UV-Durchlicht (366 nm) vorsichtig ausgeschnitten. Es wurde schwaches UV-Durchlicht verwendet, da starkes UV-Licht zu Strangbrüchen in der DNA führen kann, und somit mutagene Eigenschaften besitzt. Die Aufreinigung der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe

des QIAquick-Gelextraktions-Kits (Qiagen, Hilden) oder mit dem DNA Extraction Kit von MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

Gelelution mit dem QIAquick Gelelutionskit

Zuerst wurde die Agarose bei 50 °C durch die Zugabe eines hochsalinen Extraktionspuffers aufgelöst. Für die anschließende Aufreinigung wurde eine Silicamembran eingesetzt. Wie bereits unter 2.8.2 beschrieben, bindet die DNA in Anwesenheit caotroper Salze spezifisch an diese Membran (Vogelstein & Gillespie, 1979), da die Salze die Struktur von Wasser modifizieren (Hamaguchi & Geiduschek, 1962). Voraussetzung ist, dass der pH-Wert nicht höher als 7,5 liegt, was durch einen ebenfalls im Extraktionspuffer enthaltenen pH-Indikator überprüft werden kann. Verunreinigungen wurden in mehreren Waschschritten durch spezielle Puffer entfernt. Die Elution der DNA von der Silicamembran erfolgte in einem niedersalinen Tris-Puffer mit pH 8,5.

Gelelution mit dem DNA Extraction Kit

Das Gelelutionskit von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) wurde verwendet, um große DNA-Fragmente (>6 kb) zu eluieren. Es funktionierte ebenso wie das Kit von Qiagen nach der Methode von Vogelstein & Gillespie (1979). Nach dem Auflösen des Gels durch caotrope Salze wurde die DNA jedoch nicht an eine Silicamembran gebunden, sondern es wurden 5 µl einer Silicapulversuspension pro 2,5 µg DNA zugegeben und für 5 min bei 55 °C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Pellet 4x mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Durch Zugabe von TE-Puffer wurde die DNA von dem Silicapulver eluiert.

2.10.3 Gelelektrophorese von RNA

Zur Überprüfung der isolierten Gesamt-RNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit TAE-Puffer durchgeführt (2.10.1). Wahlweise wurde auch eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 400 mg Agarose mit 40 ml 1x NBC-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 65 °C mit 1 ml 37 %igem Formaldehyd versetzt. Die Probe wurde vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese wurde mit 1x NBC-Puffer durchgeführt.

2.11 Transformation von Bakterien

Unter Transformation versteht man in der Mikrobiologie die Aufnahme freier DNA durch Bakterien. Es handelt sich dabei um einen Vorgang, der unter bestimmten Bedingungen in der

Natur stattfinden kann. Um die Aufnahmebereitschaft von *E. coli*-Zellen für freie DNA zu erhöhen, werden die Zellen vorab mit Salzen behandelt; man spricht von kompetenten Zellen.

2.11.1 Herstellung von superkompetenten Zellen (Inoue *et al.*, 1990)

Superkompetente Zellen lassen sich im Gegensatz zu kompetenten Zellen längere Zeit bei -80 °C lagern, ohne ihre Kompetenz zu verlieren. Um superkompetente Zellen herzustellen, wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, die jedoch beide nach einem ähnlichen Prinzip funktionieren. Es handelt sich um zwei modifizierte Methoden nach Inoue *et al.*, 1990, welche chemisch kompetente Zellen über die CaCl₂-Methode erzeugen. Die Methode mit CaCl₂-Puffer ist schneller und einfacher durchzuführen als die Methode mit TB-Puffer.

Herstellung superkompetenter Zellen von *E. coli* mittels TB-Puffer

E. coli XL1-Blue wurde über Nacht auf LB-Tetracyclin-Platten (15 µg/ml) ausgestrichen. Anschließend wurde eine Kultur in 2 ml LB mit Tetracyclin bei 37 °C über Nacht angezogen und bei 2.500 g (4 °C, Eppendorf-Zentrifuge 5417 C/R, Hamburg) abgeerntet. Die Zellen wurden einmal mit sterilen Reinstwasser gewaschen, in 4 ml SOB+Mg²⁺ resuspendiert und bei 600 nm fotometrisch vermessen. Anschließend wurden 2x 125 ml SOB-Medium mit je 1,25 ml 2M Mg²⁺-Lösung supplementiert und mit der Bakteriensuspension so beimpft, dass sich eine OD₆₀₀ von 0,005 ergab. Die Anzucht der Zellen erfolgte daraufhin über Nacht bei RT und 120 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,6. Die Kultur wurde 10 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 2.500 g in einer Sorvall-RC-5B-Kühlzentrifuge (HB4-Rotor, 4 °C) abzentrifugiert und in 20 ml eiskalten TB-Puffer resuspendiert. Nach erneuter 10minütiger Inkubation auf Eis und erneuter Abzentrifugation wurden die Zellen in 5 ml Transformationspuffer aufgenommen und vereinigt. Dazu wurden 1,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) gegeben. Die Zellen wurden erneut 10 min auf Eis inkubiert, in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße aliquotiert, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Kompetenz blieb unter diesen Bedingungen für circa 3 Monate erhalten.

Herstellung superkompetenter Zellen mit CaCl₂-Lösung

E. coli XL1-Blue MRF' wurde über Nacht in LB-Medium als 40 ml-Vorkultur angezogen. Die Vorkulturen enthielten Tetracyclin in einer Konzentration von 12,5 µg/ml. Beimpft wurde von einer frischen Agarplatte. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C und 230 U/min. Je eine 400 ml LB-Kultur mit Tetracyclin wurde mit einer kompletten Vorkultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und maximal 170 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 angezogen.

Anschließend wurden die Kulturen in Zentrifugenbechern auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert (Sorvall-RC-5B-Kühlzentrifuge, HB4-Rotor). Die Pellets wurden in 10 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und daraufhin zusammengeführt. Anschließend wurde erneut 10 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde wieder in 10 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4.000 g und 4 °C wurde das Pellet in 3 ml 0,1 M CaCl₂; 15 % [v/v] Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden zu 50 µl-Aliquots in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor der Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen mit 150 µl eiskaltem 0,1 M CaCl₂ auf 200 µl aufgefüllt.

2.11.2 Überprüfung der Transformationseffizienz

Um die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen zu errechnen, wurden diese mit 1 ng des Plasmids pUC18 transformiert. Der Transformationsansatz wurde in verschiedenen Verdünnungen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transformationseffizienz betrug im Durchschnitt 4×10^7 CFU (colony forming unit) pro µg DNA pro Transformationsansatz für die mit TB-Puffer behandelten Zellen und $5,5 \times 10^7$ CFU pro µg DNA pro Transformationsansatz für die mit CaCl₂-Lösung behandelten Zellen.

2.11.3 Transformation von superkompetenten Bakterien

β-Mercaptoethanol-Methode

Zu 200 µl auf Eis aufgetauten, superkompetenten Zellen wurden 3,4 µl β-Mercaptoethanol (1:10 in Aqua demin.) gegeben. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert, auf 4 Reaktionsgefäße verteilt und anschließend mit 1-2 µl Ligationsansatz bzw. zu transformierender DNA versetzt. Nach einer 30minütigen Inkubation im Eiswasserbad erfolgte eine 45sekündige Hitzeinkubation bei 42 °C. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen für 60 min bei 37 °C in 100 µl LB-Medium angezogen. Dies erfolgte bei 350 U/min auf einem Thermoschüttler der Firma Eppendorf, Hamburg/Deutschland (Thermomixer comfort). Die gesamten 150 µl Zellen wurden auf einer LB-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen.

CaCl₂- Methode

Etwa 1-2 µl Ligationsansatz bzw. zu transformierende DNA wurden mit 100 µl eiskalter CaCl₂-Lösung versetzt und zu 50 µl auf Eis aufgetauten, superkompetenten Zellen gegeben. Die Zellen wurden 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine 2minütige Hitzeinkubation bei 42 °C. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C in 200 µl

LB-Medium bei 350 U/min auf einem Thermoschüttler der Firma Eppendorf, Hamburg/Deutschland (Thermomixer comfort) angezogen. Die gesamten 350 µl Zellen wurden auf einer Ampicillin-haltigen LB-Platte ausgestrichen

2.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur gezielten Amplifizierung einer bestimmten DNA-Sequenz (Mullis & Faloona, 1987). Als Vorbild für diese Methode dient die Replikation der Erbsubstanz in den Zellen, bei der die vorhandene DNA-Matrize in Einzelstränge aufgetrennt wird. An die Einzelstränge binden kurze komplementäre DNA-Moleküle, von denen ausgehend die DNA-Polymerase in der Lage ist, den Einzelstrang durch Verknüpfung von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) zu einem Doppelstrang zu ergänzen. *In vitro* wird eine thermostabile Polymerase aus *Pyrococcus woesei* (*Pwo*) oder aus *Thermus aquaticus* (*Taq*) verwendet, die die zur Denaturierung der DNA-Matrize benötigten hohen Temperaturen ohne großen Funktionsverlust übersteht. Der Bereich der zu amplifizierenden Sequenz lässt sich durch die Wahl der kurzen synthetischen Oligonukleotide, den so genannten Primern, bestimmen, die an die DNA-Einzelstränge binden und die Synthese des zweiten Stranges einleiten. Amplifiziert wird dementsprechend der DNA-Abschnitt, der sich zwischen den beiden Primern befindet. Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, das in einer exponentiellen Vermehrung der gewünschten Doppelstränge resultiert. Jede Runde besteht aus drei Schritten, die jeweils durch eine spezifische Temperatur gekennzeichnet sind:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize
2. Anlagerung der Primer an die komplementären Einzelstrangbereiche
3. Verlängerung der angelagerten Primer am 3'-Ende durch die DNA-Polymerase

2.12.1 Verwendete Primer

Die Wahl der Primer ist entscheidend für das Gelingen der PCR. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgeführt. Es wurden Primer zum Nachweis der Laccasegene (Tab. 7a), für die inverse PCR (Tab. 7b), für die Sequenzierung (Tab. 7c) und für den Nachweis von Haushaltsgenen (Tab. 7d) verwendet. Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) hergestellt.

Tab. 7a: Primer zum Nachweis von Laccasegenen. In dieser Arbeit verwendete Primer in 5'-3'-Richtung mit angegebener Schmelztemperatur und Herkunft (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Name	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemp. (T _M)	Herkunft/Referenz
LaccT1	CAC TGG CAC GGN TTC TTC CA	60,4 °C	D'Souza <i>et al.</i> , 1996
LaccT2	GTG ACT ATG ATA CCA GAA NGT	54,9 °C	D'Souza <i>et al.</i> , 1996
cbs2-DO	CGT G(AGC)A G(AG)T GGA TGG GGT	61,3 °C	Dohse, 2001
cbs3-DO	TC(GC) TGG TA(CT) CAC TCG CAT TTC	58,8 °C	Dohse, 2001
5-cbs1	CAC TGG CAT GGC AT(GC) CAC CAG AAG	66,1 °C	Kupferbinderegion 1 / diese Arbeit
5-cbs2	ACG TC(GT) TGG TAC CAC T(GC)G CAC T(AT)C	65,3 °C	Kupferbinderegion 2 / diese Arbeit
3-cbs2	GTA GTG CGA GTG GTA CCA CGA CGT	66,1 °C	Kupferbinderegion 2 / diese Arbeit
5-int	GG(AC) CAG CGC TAC GAC GT(GC) ATC ATC	67,0 °C	interne Sequenz / diese Arbeit
3-int	GAT GAT (GC)AC GTC GTA GCG CTG (GT)CC	67,0 °C	interne Sequenz / diese Arbeit
3-cbs3	(GC)CC GTG CAG GTG GAT (GC)GG GTG	67,6 °C	Kupferbinderegion 3 / diese Arbeit
3-cbs3*	(GC)CC GTG CAG GTG CTA (GC)GG GTG	67,6 °C	Kupferbinderegion 3 / diese Arbeit
5-cbs3	CAC CCG ATC CAC CTG CAC GGC	67,6 °C	Kupferbinderegion 3 / diese Arbeit
3-cbs4	GTG CCA GGC GAT GTG GCA GTG	65,7 °C	Kupferbinderegion 4 / diese Arbeit
5-cbs1B	ACC ACG GT(CT) CAC TGG CAC GGC	66,7 °C	Harald Kellner, modifiziert
3-cbs2B	GCT GTG GTA CCA GAA TGT (AGC)CC GCT	65,6 °C	Harald Kellner, modifiziert

Um Fragmente des Laccasegens zu amplifizieren, wurden Primer abgeleitet, die an die konservierten DNA-Abschnitte binden, welche für die Kupferbinderegionen des Proteins kodieren. Es existieren vier dieser Abschnitte (genannt cbs für copper binding sequence), von denen alle für die Ableitung der Primer verwendet wurden (Abb. 7). Eine weitere konservierte und für Laccasen spezifische Region lag zwischen cbs2 und cbs3 und wird hier als int bezeichnet. Für cbs3 wurde zusätzlich ein Primer abgeleitet, dessen Sequenz in einem Codon von der Kupferbindesequenz abwich (cbs3*). Dieser Primer wurde zu Kontrollzwecken eingesetzt. Alle Primer wurden anhand von Sequenzvergleichen verschiedener Laccasesequenzen abgeleitet (siehe 3.2.2). Zusätzlich wurden zwei Primer gegen die Kupferbinderegionen 1 (cbs1B) und 2 (cbs2B) verwendet, die von Dipl.-Biol. Harald Kellner von der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt wurden, die für basidiomycetische Laccasen optimiert worden

waren. Zu Beginn der Arbeit wurden zudem Primer für die Kupferbinderegionen verwendet, die aus anderen Arbeiten übernommen wurden. Die Primer cbs2-DO und cbs3-DO wurden ausgehend von den Kupferbinderegionen der Dihydrogeodinoxidase aus *Aspergillus terreus* abgeleitet. Die Primer LaccT1 und LaccT2 wurden für Laccasen aus Weißfäulepilzen abgeleitet.

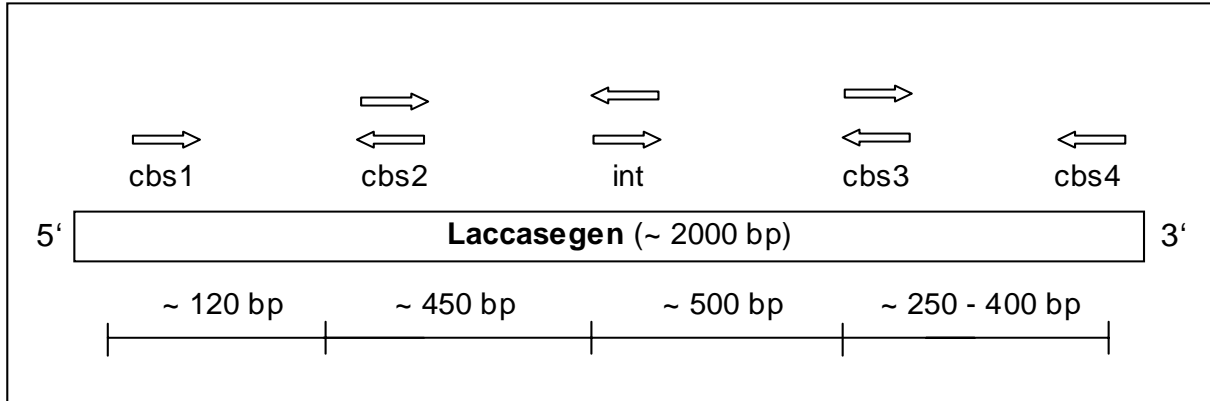


Abb. 7: Schematische Darstellung des Laccasegens und der Primerbindestellen (Pfeile). Die ungefähre Größe der erwarteten Fragmente ist angegeben.

Die Wahl der Primer für die inverse PCR unterschied sich von der Ableitung der Primer für eine Standard-PCR dadurch, dass die inversen Primer eine umgekehrte, d. h. inverse Orientierung einnehmen müssen. Während die Primer zum Nachweis der Laccasegene nur auf Grund von Sequenzvergleichen abgeleitet werden konnten, konnten die inversen Primer von bekannten DNA-Abschnitten der Laccasegene von *H. acidophila* abgeleitet werden. Die inversen Primer werden unter 2.12.4.1 genauer erläutert.

Tab. 7b: Primer für die inverse PCR. In dieser Arbeit verwendete Primer in 5'-3'-Richtung mit angegebener Schmelztemperatur und Herkunft (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Name	Sequenz (5'→ 3')	Schmelz-temp. (T _M)	Herkunft/Referenz
5-invP _{Anf}	GCT TCC GAC GAC TTG CTT ACA CTA GAC	66,5 °C	inverse PCR, cbs2/3 / diese Arbeit
3-invP _{End}	GTC TAG TGT AAG CAA GTC GTC GGA AGC	66,5 °C	inverse PCR, cbs2/3 / diese Arbeit
5-inv2i	CGT ACA CCA CCG ACA TTG TCA GCG	66,1 °C	inverse PCR, cbs2/int / diese Arbeit
3-inv2i	CAA TGA CGA GGG GAC CGA ACA TAC	64,4 °C	inverse PCR, cbs2/int / diese Arbeit
5-inv23	AGA ACG TCA TCA GCA CCG GCA ACG	66,1 °C	inverse PCR, cbs2/3 / diese Arbeit
3-inv23	CAG TCG GCC CAT GGA TGA TCA TCG	66,1 °C	inverse PCR, cbs2/3 / diese Arbeit

Name	Sequenz (5'→ 3')	Schmelztemp. (T _M)	Herkunft/Referenz
5'- invlacc1	GAC TCC CTA CAT GGA TGG TGT GCC	66,1 °C	inverse PCR, lacc1 / diese Arbeit
3'- invlacc1	CGA GTC GAG GGG ACA GTG AGT CGC	69,6 °C	inverse PCR, lacc1 / diese Arbeit
5'-inv12	CCG ATA CCC GTC AAC GGA TCC TTC	66,1 °C	inverse PCR, cbs1/2 / diese Arbeit
3'inv12	CTC CGT CCA TTT CGT TGG CCC CTC	67,8 °C	inverse PCR, cbs1/2 / diese Arbeit
5'-inv3i	GAA ATC AAC GGC CAG ACC TAC CGC	66,1 °C	inverse PCR, int/cbs3 / diese Arbeit
3'-inv3i	CAG AAG GAG GAG GTG GAG GAT GCG	67,8 °C	inverse PCR, int/cbs3 / diese Arbeit
3'-inv3i-2	GCA TGT TGC GGC ATT GAG GAG CTC	66,1 °C	inverse PCR, int/cbs3 / diese Arbeit

Da die durch die inverse PCR erhaltenen DNA-Fragmente zu groß für eine direkte Sequenzierung waren, wurden ausgehend von der bekannten Sequenz interne Sequenzierprimer abgeleitet. Die Sequenzierprimer und verwendete Kontrollprimer sind in Tabelle 7c gezeigt.

Tab. 7c: Sequenzierprimer und Kontrollprimer. In dieser Arbeit verwendete Primer in 5'-3'-Richtung mit angegebener Schmelztemperatur und Herkunft (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Name	Sequenz (5'→ 3')	Schmelztemp. (T _M)	Herkunft/Referenz
B2i-int1	GTG GTA AAC GGG ACG GTG CTG GTG	67,8 °C	inverse PCR, Sequenzier- primer / diese Arbeit
E2i-int1	GTA ACT TGG CTC ATT GGC TGC CGG	66,1 °C	inverse PCR, Sequenzier- primer / diese Arbeit
E2i-int2	TCA TGC CCG CCG ACC CGC TCA CTG	71,3 °C	inverse PCR, Sequenzier- primer / diese Arbeit
lacc1-int	CCG GAG AAT TGA AGG GCT GCG CTC	67,8 °C	inverse PCR, Sequenzier- primer / diese Arbeit
3'-LK1	CGA CAC GTA CAA GCC CGC AGA CAC	67,8 °C	Kontrollprimer für lacc1 / diese Arbeit
5'-LK2	GTG ACA CCA TGA CCT ACA CAT GGC	64,4 °C	Kontrollprimer für lacc2 / diese Arbeit
3'-LK2	TGC TCC TCA TCG TAG GAA AGG GTC	64,4 °C	Kontrollprimer für lacc2 / diese Arbeit

Die für das β -Aktin-Gen, das Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen, das Phosphoglucokinase-Gen und das Gen einer ATPase spezifischen Primer wurden verwendet, um durch die Amplifikation eines Haushaltsgens die cDNA-Synthese zu überprüfen.

Tab. 7d: Primer zum Nachweis von Haushaltsgenen. In dieser Arbeit verwendete Primer in 5'-3'-Richtung mit angegebener Schmelztemperatur und Herkunft (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Name	Sequenz (5'→ 3')	Schmelztemp. (T _M)	Herkunft/Referenz
5-act-for	CCG CCT TCT ACG TGT CCA TCC AGG	67,8 °C	β-Aktin / diese Arbeit
3-act-rev	CTC CGT CTG GAT CGG TGG TTC GAT CC	69,5 °C	β-Aktin / diese Arbeit
5-GPD	ATC AAC GGC TTC GGT CGA ATT GG	62,4 °C	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
3-GPD	TGG ACG GAG GTC ATG AGA CCC	63,7 °C	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
5-PGK	CAT CAA GCA CGC CCT CGA CAA TGG C	61,4 °C	Phosphoglucokinase
3-PGK	CTG CCC TCC TCC TCA ATG TGG AAG C	62,4 °C	Phosphoglucokinase
5-ATPase	CCT TAC CAA GAA CAA GTG TCT CTT GGT G	60,0 °C	ATPase / Bettina Kirberg
3-ATPase	GAA CGA TAA CCA CGA GAG AGA AGC CAA ATC ACC G	64,0 °C	ATPase / Bettina Kirberg

2.12.2 Standard-PCR

Die im Folgenden vorgestellte PCR soll durch die Bezeichnung Standard-PCR von der inversen PCR abgegrenzt werden, welche in einem eigenen Kapitel beschrieben wird (2.12.4).

PCR auf genomischer DNA bzw. Plasmid-DNA

Genomische DNA von *H. acidophila* wurde isoliert und 1:10 in Reinstwasser verdünnt in die PCR eingesetzt. Plasmid-DNA wurde ebenfalls verdünnt in die PCR eingesetzt. Ein Standardreaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

DNA-Matrize	100-500	ng
Oligonukleotidprimer 5'	100	pmol
Oligonukleotidprimer 3'	100	pmol
10 x Polymerasepuffer	5	μl
MgCl ₂	1,5	mM
dNTP-Mix	0,2	mM
Taq-Polymerase	2,5	U
Reinstwasser	ad 50	μl

Bei Bedarf wurden Primerkonzentration und MgCl₂-Konzentration variiert. Die einzelnen Komponenten wurden in ein 200 μl-Reaktionsgefäß gegeben. Die Taq-Polymerase (rekombinant,

MBI Fermentas, ST. Leon-Rot) wurde erst bei Erreichen der Denaturierungstemperatur zugegeben, um unspezifische Kettenverlängerungen zu verhindern („Heißstart“). Bei Bedarf wurde die Elongationszeit verkürzt. Die PCR erfolgte in einem MiniCycler-PCR-Gerät der Firma MJ-Research (Waltham/MA, USA). Zusätzlich zur *Taq*-Polymerase wurden die *Pfu*-DNA-Polymerase von MBI Fermentas (St-Leon-Rot) und das GC Rich PCR-System von Roche Diagnostics (Mannheim) ausprobiert. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 8 aufgeführt.

1. Initialdenaturierung	95 °C	5 min
2. Zyklus (30 x) Denaturierung Anlagerung Elongation	94 °C variabel 72 °C	45 sec 45 sec 1 min
3. Verlängerte Elongation	72 °C	7 min

Tab. 8: Verwendetes Standard-PCR-Programm. Die Anlagerungstemperatur und die Elongationszeit wurden bei Bedarf variiert.

Kolonie-PCR

Diese Methode dient dem Nachweis eines bestimmten DNA-Fragments in Bakterienzellen. Klone, die ein Plasmid mit einem bestimmten Insert aufgenommen haben, konnten so detektiert werden, wenn die richtigen Primer eingesetzt wurden. Hierfür wurde Zellmaterial einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und in 38,5 µl Reinstwasser resuspendiert. Die übrigen Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes wurden anschließend dazu gegeben. Als Programm wurde das oben beschriebene verwendet (Tab. 8), allerdings wurde die Initialdenaturierung auf 10 min verlängert, um die Zellen aufzuschließen.

PCR zur Herstellung digoxigeninmarkierter Sonden

Digoxigeninmarkierte Sonden für den Einsatz im Southern Blot oder in der Koloniehybridisierung wurden mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) hergestellt. Als Matrize für die Reaktion wurde ein Plasmid eingesetzt, das das zu markierende Fragment trug. Die PCR wurde mit den entsprechenden Primern nach dem Standard-PCR-Programm (Tab. 8) und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Standard-PCR-Mix angesetzt. Nach der PCR wurden Proben und Kontrollen auf ein Agarosegel aufgetragen, um den Einbau des Digoxigenins zu überprüfen. Dies ist optisch möglich, da die digoxigeninmarkierten Fragmente größer sind als die unmarkierten und sich deshalb im Agarosegel langsamer bewegen. Bei erfolgreichem Einbau wurde der komplette Reaktionsansatz auf ein Gel aufgetragen, um die Sonde aus dem Gel eluieren zu können (2.10.2).

2.12.3 RT-PCR zur Synthese von cDNA

Anschließend an die mRNA-Isolation wurde ein Teil der isolierten mRNA in cDNA umgeschrieben. Dies ist notwendig, da mRNA sehr leicht von RNasen abgebaut wird und deshalb instabil ist. Zudem ist es nicht möglich, auf RNA eine PCR durchzuführen. Die cDNA-Synthese erfolgt durch eine Reverse Transkriptase (RT), ein Enzym welches aus Retroviren stammt und in der Lage ist, einzelsträngige mRNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben. Es kommt zuerst zur Synthese eines DNA-Einzelstranges an der RNA-Matrize. Der DNA-Strang löst sich im Folgenden von der RNA und wird zu einem Doppelstrang ergänzt. Die cDNA-Synthese erfolgte in einem MiniCycler-PCR-Gerät der Firma MJ-Research (Waltham /MA, USA). Die Ansätze wurden auf Eis angesetzt. Für die cDNA-Synthese wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet, das Primern enthält, die an den PolyA-Schwanz der mRNA binden. Es wurden 10 ng bis 0,5 µg mRNA oder 100 ng bis 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die PCR-Ansätze waren folgendermaßen zusammengesetzt:

RNA	x	µl
Oligo(dT)Primer	1	µl
Reinstwasser	ad 12	µl

Das PCR-Programm wurde nach der ersten Inkubation bei 70 °C unterbrochen (Tab. 9). Die Reaktionsansätze wurden kurz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Anschließend wurden folgende Bestandteile hinzugegeben:

5x Reaktionspuffer	4	µl
10 mM dNTP-Mix	2	µl
Ribonuclease Inhibitor	1	µl (20 U)

Nach einem weiteren Inkubationsschritt bei 37 °C wurde 1 µl (200 U) der Reversen Transkriptase M-MuLV hinzugegeben.

5 min	70 °C	Pause → Zugabe von Puffer und dNTPs
5 min	37 °C	Pause → Zugabe der Polymerase
60 min	42 °C	cDNA-Synthese
10 min	70 °C	Inaktivierung der Reversen Transkriptase

Tab. 9: PCR-Programm zur cDNA-Synthese. Nach den ersten beiden Schritten wurde das Programm abgebrochen, um Reagenzien hinzuzufügen.

2.12.4 Inverse PCR

Die inverse PCR dient zur Amplifikation von unbekannten DNA-Abschnitten, die an eine Region bekannter Sequenz angrenzen (Ochman *et al.*, 1988). Die PCR wird mit Primern durchgeführt, die voneinander weg orientiert sind, und deshalb erst eine Amplifikation ermöglichen, wenn es zu einem Ringschluss der Matrice gekommen ist (Abb. 8). Bei dieser handelt es sich um ein Restriktionsfragment, welches durch Selbstligation zirkularisiert wird. Der DNA-Ring kann durch ein zweites Restriktionsenzym, welches in der bekannten Sequenz schneidet, wieder linearisiert werden, um die PCR zu vereinfachen. Es wurden verschiedene Protokolle für die inverse PCR ausgearbeitet, die zusammengefasst beschrieben werden. Eine Methode ermöglicht, gezielt das an das bekannte Fragment angrenzende 5'- oder das 3'-Ende aufzufinden, eine andere Methode verwendet Restriktionsfragmente, die das bekannte Fragment in der Mitte tragen, so dass beide flankierenden Enden amplifiziert werden können. Die durch PCR amplifizierten und sequenzierten Fragmente cbs1/2, cbs2/int, cbs2/3 und int/cbs3 wurden als Grundlage für die inverse PCR verwendet.

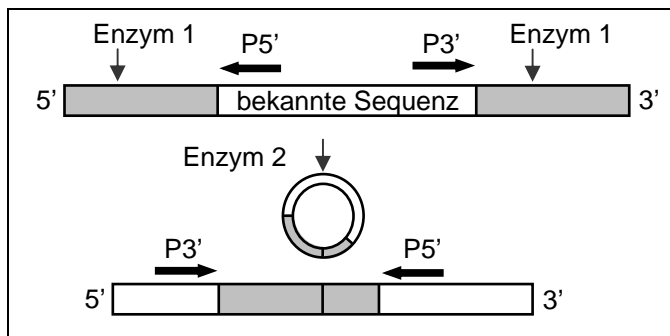


Abb. 8: Prinzip der inversen PCR. Die inverse PCR funktioniert nur, wenn die Restriktionsfragmente selbstligiert werden, da die Primer (P) in inverser Orientierung vorliegen. Nach der Selbstligation können die zirkulären DNA-Fragmente mit einem zweiten Restriktionsenzym geöffnet werden, um die PCR zu erleichtern.

2.12.4.1 Wahl von Restriktionsenzymen und Primern

Die Wahl der Restriktionsenzyme und der Lage der Primer hängt in erster Linie davon ab, ob nur ein 5'- oder 3'-Ende oder gleichzeitig beide flankierenden Sequenzen amplifiziert werden sollen.

Suche von einer flankierenden Region

Die Wahl der Restriktionsenzyme wurde so durchgeführt, dass das Enzym für die anfängliche vollständige Restriktionsspaltung genau einmal in der bekannten Sequenz schneidet, und zwar entweder relativ zu Beginn oder am Ende. Die reversen Primer können dann ausgehend von der bekannten Sequenz abgeleitet werden, wobei beachtet werden muss, dass beide diesseits der Restriktionsschnittstelle des ersten Restriktionsenzyms binden. Das zweite Restriktionsenzym muss so gewählt werden, dass es zwischen den beiden reversen Primerbindestellen schneidet.

Für das cbs2/3-Fragment (*lacc1*) wurden folgende Restriktionsenzyme und Primer ausgewählt:

Für die am 5'-Ende anschließende Region:

Restriktionsenzym 1: *SphI*, Restriktionsenzym 2: *AviII*

3'-Primer (3'-cbs2): 5'-gta gtg cga gtg gta cca cga cgt-3'

5'-Primer (5'-invP_{Anf}): 5'-gct tcc gac gac ttg ctt aca cta gac-3'

Für die am 3'-Ende anschließende Region:

Restriktionsenzym 1: *XhoI*, Restriktionsenzym 2: *ApaLI*

3'-Primer (3'-invP_{Ende}): 5'-gtc tag tgt aag caa gtc gtc gga agc-3'

5'-Primer (5'-int): 5'-gct tcc gac gac ttg ctt aca cta gac-3' oder wahlweise

3'-Primer (3'-int): 5'-gat gat (gc)ac gtc gta gcg ctg (gt)cc-3'

5'-Primer (5'-cbs3): 5'-cac cc(cg) tag ctc ctg cac gg(gc)-3'

Für das Auffinden des 5'-Endes von *lacc1* nachdem der Rest des Gens bekannt war, wurden die folgende Restriktionsenzyme und Primer ausgewählt:

Restriktionsenzym 1: *AviII*, *Bsp68I*, *HindIII*, *PstI*, *PvuII*, *SmaI*, *StuI*, *XhoI*

3'-Primer (3'-lacc1): 5'-cga gtc gag ggg aca gtg agt cgc -3'

5'-Primer (5'-lacc1): 5'-gac tcc cta cat gga tgg tgt gcc -3'

Die Fragmente cbs2/int (*lacc2*), int/cbs3 (*lacc3*) und cbs1/2 (*lacc4*) wurden nicht mit dieser Methode untersucht.

Suche beider flankierender Regionen

Bei dieser Methode wurden Enzyme gewählt, die nicht in der bekannten Sequenz schneiden. Sie hatte den Vorteil, dass die Größe der zu erwartenden PCR-Produkte für die Fragmente cbs2/int und cbs2/3 bekannt war, da die Restriktionsenzyme verwendet werden konnten, die bereits im Southern Blot zum Einsatz gekommen waren (3.3.1.2). Die Größe der zu erwarteten PCR-Produkte für die Fragmente cbs1/2 und int/cbs3 war dagegen nicht bekannt.

Wahl der Primer und der Restriktionsenzyme

Als Restriktionsenzym für die Gesamthydrolyse der genomischen DNA wurden die Restriktionsenzyme *BamHI* und *EcoRI* verwendet, die bereits für den Southern Blot eingesetzt worden waren. Folgende Primer und zweite Restriktionsenzyme wurden verwendet:

Für das cbs2/3-Fragment (*lacc1*):

Restriktionsenzym 2: *Apa*LI

3'-Primer (3'-inv23): 5'- cag tcg gcc cat gga tga tca tcg -3'

5'-Primer (5'-inv23): 5'- aga acg tca tca gca ccg gca acg-3'

Für das cbs2/int-Fragment (*lacc2*):

Restriktionsenzym 2: *Cfr*9I

3'-Primer (3'-inv2i): 5'- caa tga cga ggg gac cga aca tac-3'

5'-Primer (5'-inv2i): 5'- cgt aca cca ccg aca ttg tca gcg-3'

Für die Fragmente int/3 (*lacc3*) und cbs1/2 (*lacc4*) wurden mehrere Restriktionsenzyme verwendet. Auf eine zweite Hydrolyse zur Linearisierung wurde verzichtet.

Für das cbs1/2-Fragment:

Restriktionsenzym 1: *Avi*II, *Bsp*68I, *Hind*III, *Pst*I, *Pvu*II, *Sma*I, *Stu*I, *Xho*I

3'-Primer (3'-inv12): 5'- ctc cgt cca ttt cgt tgg ccc ctc -3'

5'-Primer (5'-inv12): 5'- ccg ata ccc gtc aac gga tcc ttc -3'

Für das int/cbs3-Fragment:

Restriktionsenzym 1: *Avi*II, *Bsp*68I, *Hind*III, *Pst*I, *Pvu*II, *Sma*I, *Stu*I, *Xho*I

3'-Primer (3'-inv3i): 5'- cag aag gag gag gtg gag gat gcg -3'

5'-Primer (5'-inv3i): 5'- gaa atc aac ggc cag acc tac cgc -3'

2.12.4.2 Vorbereitung der Proben für die PCR

Bei der Vorbereitung von Proben, die in die inverse PCR eingesetzt werden sollen, sind die Ligationsbedingungen kritisch. Verschiedene Parameter wurden deshalb variiert.

Restriktionsspaltung und Selbstligation

Es wurden 4 µg genomische DNA über Nacht mit 40 U Restriktionsenzym in 50 µl Gesamtvolumen bei 37 °C gespalten. Das Enzym wurde anschließend 20 min bei 80 °C hitzeinaktiviert. Die gesamte hydrolysierte DNA wurde entweder direkt in die Ligation eingesetzt oder auf ein Agarosegel aufgetragen, aus dem die gewünschten DNA-Fragmente, wie unter 2.10.2 beschrieben, eluiert wurden. Diese Eluate wurden alternativ zum gesamten Restriktionsansatz für die Ligation verwendet. Der 50-µl-Restriktionsansatz wurde in 100 µl

Gesamtvolumen ligiert (DNA-Konzentration: 40 ng/μl). Bei der Verwendung von Eluaten wurde eine DNA-Konzentration von 1,6 ng/μl eingestellt. Vor der Ligation wurden die Ansätze für 5 min bei 50 °C inkubiert und dann direkt auf Eis gestellt, um eine unspezifische Aneinanderlagerung der Fragmente zu verhindern. Die Ligasekonzentration betrug 25 U, ligiert wurde über Nacht bei 22 °C. Ein Abstoppen der Ligation wurde durch 10minütiges Inkubieren bei 65 °C erreicht. Die selbstligierte DNA konnte direkt in die PCR eingesetzt werden. Wahlweise konnte eine Fällung und/oder eine zweite Restriktionsspaltung durchgeführt werden.

Kinasereaktion

Um die Ergebnisse der Ligation zu verbessern, wurde teilweise vor der Ligation eine Phosphorylierung mit der T4 Polynucleotide Kinase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Für den Fall, dass während der Gelelektion Phosphatreste am 5'-Ende verloren gingen, sollte die Kinase diese zur Ligation benötigten Phosphatreste bereitstellen. Bei direktem Einsatz der hydrolysierten DNA sollte dieser Schritt nicht nötig sein, wurde jedoch zur Kontrolle durchgeführt. Dazu wurden dem Restriktionsansatz nach Hitzeinaktivierung Kinase (30U), dATP (0,2 mM) und Puffer zugesetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 μl 1 M EDTA-Lösung (pH 8) abgestoppt. Durch Zugabe von 60 μl Chloroform und 5minütiger Zentrifugation bei 13.000 g wurde die DNA gefällt. Sie konnte in die Ligation eingesetzt werden.

Fällung und zweite Restriktionsspaltung

Vor der anschließenden PCR konnte die DNA im Ligationsansatz über eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI) gefällt werden. Es wurden 100 μl PCI zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde 5 min bei 13.600 g zentrifugiert (RT) und die Oberphase abgenommen. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat und 1 Volumen Isopropanol. Nach 30minütiger Inkubation bei -20 °C wurde für 5 min bei 13.600 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 20 μl Aqua demin. aufgenommen. Um unspezifische PCR-Produkte durch Bindung der reversen Primer in falscher Orientierung zu verhindern, konnten die zirkulären DNA-Fragmente bei Bedarf mit einem zweiten Restriktionsfragment linearisiert werden. Die Restriktion erfolgte mit 1 μg DNA pro Restriktionsansatz in 20 μl Gesamtvolumen mit 10 U Enzym für 1-3 h bei 37 °C. Das Restriktionsenzym wurde vor der PCR 20 min bei 65 °C inaktiviert. Auf einen weiteren Fällungsschritt konnte so verzichtet werden.

2.12.4.3 PCR mit inversen Primern

Es wurden jeweils 100-200 ng DNA in die PCR-Reaktion eingesetzt, sofern der gesamte Ansatz mit hydrolysierteter DNA für die Ligation verwendet worden war. Bei Verwendung von Eluaten wurden nur DNA-Mengen von 20-100 ng eingesetzt. Folgende Varianten der PCR wurden verwendet:

1. Standard-PCR mit der *Taq*-Polymerase
2. PCR mit dem GC-Rich PCR-System
3. PCR mit dem High Fidelity Enzym-Gemisch
4. PCR mit dem Advantage-GC Genomic PCR Kit

Für alle PCR-Varianten gilt, dass die Primer-Anlagerungstemperaturen und die Elongationszeiten abhängig von den Primern und den Fragmentlängen der erwarteten PCR-Produkte variiert wurden. Für die Primerkombinationen inv2i und inv23 wurde eine Anlagerungstemperatur von 60 °C gewählt, für die invP-Primerkombination eine Anlagerungstemperatur von 62 °C und für die Primerkombinationen inv12, inv3i und lacc1 eine Anlagerungstemperatur von 63 °C. Die Elongationstemperatur hängt vom verwendeten Enzym ab und wird deshalb für jedes PCR-System separat beschrieben.

1. Standard-PCR mit der *Taq*-Polymerase:

Die PCR wurde im Wesentlichen durchgeführt wie unter 2.12.2. beschrieben. Diese PCR unter Verwendung der *Taq*-Polymerase wurde für die Amplifikation der Fragmente B2i und E2i eingesetzt. Das im Southern Blot erhaltene B2i-Fragment war circa 2,5 kb groß, abzüglich der durch die Primerwahl vorgegebenen 500 bp sollte das PCR-Produkt in der inversen PCR 2 kb groß sein. Deshalb wurde eine Elongationszeit von 2 min gewählt. Das im Southern Blot erhaltene E2i-Fragment war circa 4,6 kb groß, abzüglich der durch die Primerwahl vorgegebenen 500 bp sollte das PCR-Produkt in der inversen PCR 4 kb groß sein. Deshalb wurde eine Elongationszeit von 5 min gewählt. Diese PCR wurde zudem verwendet, wenn die Größe der zu erwarteten Fragmente nicht bekannt war. Die Elongationszeit wurde von 2-4 min variiert.

2. PCR mit dem GC-Rich PCR-System

Alternativ wurde das GC-Rich PCR System der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde folgendermaßen zusammengestellt:

Oligonukleotidprimer 5'	100	pmol	
Oligonukleotidprimer 3'	100	pmol	
10 x Polymerasepuffer	5	µl	(mit 1,5 mM MgCl ₂ und DMSO)
dNTP-Mix	0,2	mM	
Enzym-Mix	2-2,5	U	
Reinstwasser	ad 50	µl	

Verwendet wurde das PCR-Programm der Standard-PCR (Tab. 8). Ansonsten wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren.

3. PCR mit dem High Fidelity Enzym-Gemisch

Das High Fidelity Enzym-Gemisch von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) dient zur Amplifikation langer PCR-Fragmente (bis zu 9 kb auf humaner DNA) mit hoher Genauigkeit. Der Standard-Reaktionsansatz war zusammengesetzt wie der des GC Rich PCR Systems. Als PCR-Programm wurde ebenfalls das Standard-PCR-Programm benutzt (Tab. 8) mit einigen Veränderungen bei der Amplifikation von Fragmenten größer als 3 kb. So wurde die Elongationstemperatur auf 68 °C herabgesetzt und die Elongationszeit, die 1 min/kb betrug, pro Zyklus um weitere 10 s verlängert.

4. PCR mit dem Advantage-GC Genomic PCR Kit

Das Advantage-GC Genomic PCR Kit (BD Biosciences, Heidelberg) dient ebenfalls zur Amplifikation langer und GC-reicher PCR-Fragmente, wobei bis zu 20 kb erreicht werden können. Besonderheiten des Kits sind eine durch einen Antikörper geschützte Heißstart-Polymerase und ein als GC-Melt bezeichneter Zusatz, der die Amplifikation GC-reicher Sequenzen ermöglichen soll. Der Standard-Reaktionsansatz war im Wesentlichen zusammengesetzt wie der des GC Rich PCR Systems, nur enthielt der Puffer kein MgCl₂. Es wurde Magnesiumacetat in einer Konzentration von 1,1 mM zugesetzt. GC-Melt wurde in einer Konzentration von 1 M eingesetzt, die Konzentration der Polymerase betrug 5-6 U pro Ansatz. Im Allgemeinen wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 10 aufgeführt.

1. Initialdenaturierung	95 °C	1 min
2. Zyklus (30 x)		
Denaturierung	94 °C	30 sec
Anlagerung	60 °C	45 sec
Elongation	68 °C	3 / 6 min
3. Verlängerte Elongation	68 °C	3 / 6 min

Tab. 10: Verwendetes PCR-Programm bei Verwendung des Advantage-GC Genomic PCR Kit. Bei Fragmentgrößen kleiner als 5 kb wurden 3 min Elongationszeit eingestellt, bei Größen zwischen 5-9 kb 6 min.

2.13 Southern Blot

Ziel des Southern Blot ist es, DNA-Fragmente, die zuvor mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge getrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren, um später durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können. Ein Southern Blot wurde verwendet, um die Größe der Fragmente zu ermitteln, die die Laccase-gene trugen, wenn diese mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten worden war. So sollten die besten Randbedingungen für die Herstellung einer partiellen genomischen DNA-Bank ermittelt werden.

2.13.1 Gelelektrophorese und Kapillarblot

Es wurden 5-10 µg mit einem geeigneten Restriktionsenzym gesplattene genomische DNA pro Spur auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in der Hoefer Gelkammer HE 95X (Amersham Biosciences, San Francisco/CA, USA) bei 110 V für 3-4 h durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit einem Lineal vermessen und auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Anschließend wurde das Gel für 20 min in 0,25 M HCl depuriniert. Die Denaturierung der DNA erfolgte 2x 15 min mit Denaturierungslösung, die Neutralisation 2x 15 min in Neutralisationslösung. Zwischen beiden Schritten wurde das Gel kurz in Reinstwasser gewaschen. Nach dieser Vorbehandlung erfolgte der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Biosciences, San Francisco/CA, USA) mit Hilfe eines Kapillarblots (Maniatis *et al.*, 1982). Dazu wurde 20x SSC in eine Wanne gefüllt und eine Glasplatte darüber gelegt. Auf dieser Platte lag ein Filterpapier, das mit seinen Enden in dem Puffer hing. Darauf wurden das Gel und darüber die Membran luftblasenfrei gelegt. Die Geltaschen wurden auf der Membran markiert. Um ausreichend Saugwirkung auszuüben, wurden einige Lagen Whatman-Papier und darüber weitere saugfähige Papiertücher als Saugstapel aufgelegt und mit Glasplatte und Gewicht beschwert. Der Blot wurde über Nacht bei RT durchgeführt. Nach Beendigung des Kapillarblots wurde das Gel mit Ethidiumbromid gegengefärbt und die Membran mit 10x SSC angefeuchtet und im UV-Crosslinker (Bio-Link® BLX, Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich) mit UV-Licht bestrahlt (0,12 J/cm², 50 sec), um die DNA quervernetzen und sie auf der Membran zu fixieren.

2.13.2 Hybridisierung

Als Sonden wurden die digoxigeninmarkierten Laccasefragmente cbs2/int, cbs2/3, int/cbs3 und nested-550 verwendet. Die Sonden wurden mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis-Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) hergestellt, wie unter 2.12.2 beschrieben. Die Vorhybridisierung erfolgte

für 30 min in Dig Easy Hyb Hybridisierungspuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bei RT. Die Hybridisierung erfolgte in dem Universal-Hybridisierungsschrank APT.Line BFED der Binder GmbH, Tuttlingen bei 40-43 °C über Nacht mit einer Sondenkonzentration von 25 ng/ml in Dig Easy Hyb Hybridisierungspuffer. Am Morgen nach der Hybridisierung wurde die Membran 2x 5 min mit 2x SSC; 0,1 % SDS bei RT gewaschen und 2x 15 min je nach gewünschter Stringenz bei 68-70 °C mit 0,5x SSC; 0,1 % SDS bzw. 0,1x SSC; 0,1 % SDS.

2.13.3 Kolorimetrische Detektion

Die Membran wurde 5 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 h mit Blockierungslösung inkubiert, um alle freien Bindungsstellen abzudecken. Anschließend wurde für 1 h der Alkalische Phosphatase-Antikörper (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gegen Digoxigenin dazu gegeben. Nach Abnahme des Antikörpers wurde die Membran 2x 15 min mit Waschpuffer gewaschen, für 5 min in Detektionspuffer äquilibriert und anschließend je nach Stärke der Reaktion für 0,5-16 h mit Färbelösung inkubiert, welche einen BCIP/NBT-Mix von Roche Diagnostics (Mannheim) als Substrat für die Alkalische Phosphatase enthielt. Die Reaktion wurde mit TE-Puffer abgestoppt.

2.14 Herstellung einer genomischen DNA-Bank

Um die vollständige Sequenz der Laccasegene auf genomischer DNA-Ebene zu ermitteln, wurden partielle genomische DNA-Banken hergestellt (Abb. 9). Die Ergebnisse des durchgeführten Southern Blots erleichterten die Erstellung der Genbanken, da die Größe der Restriktionsfragmente, auf denen die Laccasegene lagen, sehr genau bekannt war. Aus diesem Grund musste nicht die gesamte hydrolysierte DNA in die Ligationsansätze eingesetzt werden, sondern es konnten die Restriktionsfragmente der gewünschten Fragmentgröße ausgewählt werden. Die Genbanken wurden anschließend mit Hilfe der Sonden cbs2/int und cbs2/3 auf Anwesenheit des richtigen Fragmentes überprüft. Positive Klone wurden zur Sicherheit mittels Kolonie-PCR überprüft.

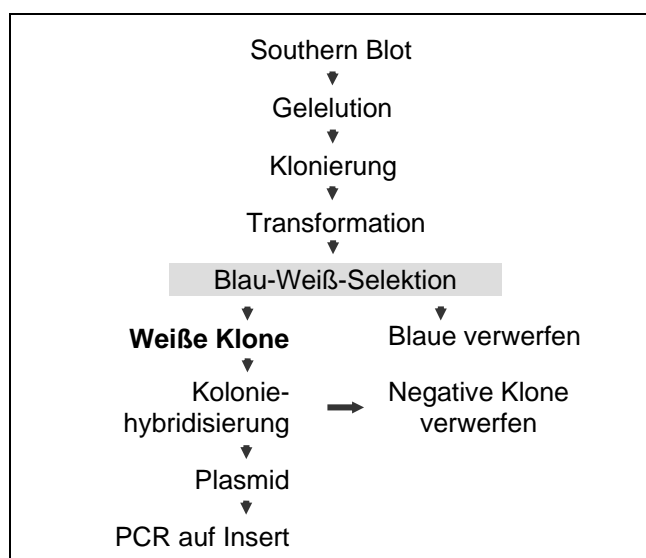


Abb. 9: Übersicht über Herstellung und Durchmusterung der partiellen genomischen DNA-Banken. Aus dem Gel eluierte DNA-Fragmente wurden kloniert und in Bakterien transformiert. Die Größe der Genfragmente war durch Southern Blot Analysen bekannt. In der Blau-Weiß-Selektion positive Klone wurden in die Koloniehybridisierung eingesetzt. Die Plasmide der positiven Klone wurden mittels PCR weiter untersucht.

2.14.1 Vorbereitung der Eluate

Es wurden 5-10 µg genomische DNA von *H. acidophila* über Nacht mit 40 U *Bam*HI bzw. *Eco*RI (MBI Fermentas) hydrolysiert. Anschließend erfolgte eine 20minütige Hitzeinaktivierung bei 65 °C. Die Restriktionsansätze wurden mit Hilfe von Microcon YM-50 Konzentratoren (Millipore) eingengt und vollständig auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Größen, der aus dem Gel ausgeschnittenen Fragmente sind in Tabelle 11 angegeben.

Restriktionsenzym	Fragmentgrößen
<i>Bam</i> HI, cbs2/int (<i>lacc</i> 2)	2,0 - 3,0 kb
<i>Bam</i> HI, cbs2/3 (<i>lacc</i> 1)	5,5 - 6,5 kb
<i>Eco</i> RI, cbs2/int (<i>lacc</i> 2)	4,0 - 6,0 kb
<i>Eco</i> RI, cbs2/3 (<i>lacc</i> 1)	8,0 - 10,0 kb

Tab. 11: Fragmentgrößen der Laccase-tragenden Restriktionsfragmente. Dargestellt sind die Fragmentgrößen von Restriktionsfragmenten genomischer DNA, die mit den Sonden cbs2/int und cbs2/3 hybridisiert haben. Die DNA war zuvor mit *Bam*HI oder *Eco*RI gespalten worden.

Nach der Elution wurden die Eluate mittels PCR daraufhin überprüft, ob das gewünschte DNA-Fragment enthalten war. Dazu wurden je 2 µl Eluat mit den Primer-Kombinationen cbs2/int und cbs2/3 in eine Standard-PCR (2.12.2) eingesetzt. Die Anlagerungstemperatur lag bei 60 °C (für cbs2/int) bzw. bei 62 °C (für cbs2/3).

2.14.2 Vorbereitung des Vektors

Für die Herstellung der partiellen genomischen DNA-Bank wurde der Vektor pBlueScript SK (+) verwendet, da dieser die Blau-Weiß-Selektion ermöglicht und relativ große DNA-Fragmente aufnehmen kann (bis 16 kb). Es handelt sich bei dem Vektor um ein Phagemid, eine Fusion des M13-Phagen und eines Plasmids. Um den Vektor für die anschließende

Ligation vorzubereiten, wurden 2,5 µg für 3 h bei 37 °C mit 10 U *Bam*HI bzw. *Eco*RI inkubiert. Nach 20minütiger Hitzeinaktivierung bei 65 °C wurde 1 µl CIAP (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) hinzugegeben. Die Dephosphorylierung erfolgte 30 min bei 37 °C. Die alkalische Phosphatase wurde ebenfalls hitzeinaktiviert (15 min, 85 °C). Der hydrolysierte Vektor wurde auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und anschließend aus dem Gel eluiert.

2.14.3 Ligation und Transformation

Vektor und Insert wurden auf eine nahezu gleiche DNA-Konzentration von circa 10-20 ng/µl eingestellt. Die Menge an Picomolenden wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Picomolenden} / \mu\text{g DNA} = (2 \times 10^6) / (\text{bp} \times 660)$$

Das Insert wurde in einem Verhältnis zum Plasmid von 2:1 eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Verwendet wurde die T4-Ligase der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Die Transformation erfolgte wie unter 2.11 beschrieben in die Bakterienstämme *E. coli* XL1-Blue und XL1- Blue MRF' (Stratagene, La Jolla/ CA, USA). Nach der Transformation wurden die gesamten Transformationsansätze auf LB-Amp-Agarplatten mit IPTG und XGal ausplattiert.

Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion dient zur Erkennung von Kolonien, die ein Plasmid aufgenommen haben, welches ein Insert in die Multiple Klonierungsstelle inseriert hat. Das Plasmid enthält dafür den N-terminalen Teil des *lacZ*-Gens, das α-Fragment, in der Multiplen Klonierungsstelle. Ein für die Blau-Weiß-Selektion geeigneter Bakterienstamm wie *E. coli* XL1-Blue und seine Derivate tragen auf dem F'-Episom den C-terminalen Teil des *lacZ*-Gens, das so genannte ω-Fragment. Werden beide Genfragmente exprimiert, entsteht eine funktionsfähige β-Lactamase. Die β-Lactamase spaltet das künstliche Substrat XGal, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Um die *lacZ*-Expression zu induzieren, wird IPTG als Induktor dazugegeben, welches an den *lac*-Operator bindet. Wenn ein Insert in die Multiple Klonierungsstelle inseriert wurde, so kann das α-Fragment des *lacZ*-Gens nicht mehr exprimiert werden und die Kolonien bleiben weiß.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurden LB-Platten verwendet, die entweder nur Ampicillin oder Ampicillin und Tetracyclin enthielten. Bei Zugabe von Ampicillin können nur Klone überleben, die ein Plasmid aufgenommen haben. Die Zugabe von Tetracyclin verhindert das Wachstum von Klonen, die das F'-Episom verloren haben, da diese weiße Kolonien bilden würden, selbst wenn das α-Fragment des *lacZ*-Gens intakt vorläge. IPTG und XGal wurden direkt beim Gießen der

Platten hinzugegeben, so dass die Konzentrationen 0,2 mM für IPTG (Stammlösung 200 mM) und 80 µg/ml für XGal (Stammlösung 4 % in DMF) betragen. Alternativ konnten die LB-Amp-Platten 30 min vor ihrer Verwendung mit 100 µl 40 mM IPTG und 100 µl 2 % XGal überschichtet werden. Nach dem Ausplattieren der Transformationsansätze wurden die Platten 2 h im Kühlschrank gelagert, um die Färbung zu verstärken, und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.14.4 Durchmusterung der Bank mittels Filterhybridisierung und PCR

Die nach der Transformation erhaltenen Klone wurden mit Hilfe von Filtertests auf die Anwesenheit des gewünschten Fragmentes überprüft. Diese Methode funktioniert im Wesentlichen wie der unter 2.13 beschriebene Southern Blot. Es wurden die gleichen digoxigeninmarkierten Sonden cbs2/int und cbs2/3 verwendet. Positive Klone wurden daraufhin erneut mit Hilfe der Kolonie-PCR überprüft. Da bei diesen Klonen die jeweilige Sonde gebunden hat, sollte in der PCR bei Verwendung der Primer cbs2/int und cbs2/3 das den Sonden komplementäre Genfragment amplifiziert werden.

Filterhybridisierung

Zur Filterhybridisierung wurden runde Nitrocellulosefilter (Biodyne A/0,2 µm der Firma Pall, Dreieich) für 1 min auf eine mit frischen Transformanten bedeckte Agarplatte gelegt, um die Kolonien zu übertragen. Der Filter wurde abgezogen und für 1 min auf ein in 0,5 M NaOH getränktes Whatman-Papier, anschließend für 1 min auf ein in 1 M Tris-HCl (pH 7,6) getränktes Whatman-Papier und abschließend für 1 min auf ein in 1 M Tris-HCl (pH 7,6); 1,5 M NaCl getränktes Whatman-Papier gegeben. Um Bakterienrückstände zu entfernen, wurden alle Filter kurz in 1 M Tris-HCl (pH 7,6); 1,5 M NaCl gespült. Anschließend wurden die Filter getrocknet und genauso wie der Southern Blot mit der DNA-Vernetzung über UV-Strahlen und anschließender Hybridisierung (2.13) weiterbehandelt. Als Kontrollen wurden in der Filterhybridisierung Kolonien von *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* XL1-Blue pBlueScript SK (+), *E. coli* XL1-Blue pcbs2/int und *E. coli* XL1-Blue pcbs2/3 eingesetzt.

Verifizierung von positiven Klonen mittels PCR

In der Filterhybridisierung positive Klone wurden erneut mittels Kolonie-PCR (2.12.2) mit den entsprechenden Primerkombinationen cbs2/int und cbs2/3 überprüft. Zudem wurden Plasmide isoliert und restriktionsgespalten. Wies das Insert die richtige Größe auf, so wurde es aus dem Agarosegel eluiert und erneut in die PCR mit den entsprechenden Primern eingesetzt.

Das dabei entstandene PCR-Fragment wurde ebenfalls aus dem Gel eluiert und sequenziert, um die Sequenz mit der Sondensequenz zu vergleichen können.

2.15 DNA-Sequenzierung

DNA-Fragmente, welche sequenziert werden sollten, wurden in den Vektor pGEM-T Easy oder den Vektor pBlueScript SK (+) kloniert. Wahlweise wurden auch PCR-Produkte aus einem Agarosegel aufgereinigt und direkt sequenziert. An Hand geeigneter Primer, die im Vektor oder auf der zu sequenzierenden Sequenz binden (pUC/M13 Forward und pUC/M13 Backward), wurden die DNA-Sequenzierungen mit Hilfe der Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Durch Replikation wird eine Kopie der einzelsträngigen, zu sequenzierenden Sequenz hergestellt, wobei in den Reaktionsansätzen zusätzlich zu den fluoreszenzmarkierten Desoxynukleotiden auch Didesoxynukleotide vorkommen, die einen Kettenabbruch bewirken. Für jedes Didesoxynukleotid existiert ein PCR-Ansatz, der im Anschluss an die Synthese elektrophoretisch aufgetrennt wird. Die entstandenen Fragmente können über ihre Fluoreszenz sichtbar gemacht werden und zeigen durch ihre Größe die Reihenfolge der Nukleotide an. Die Sequenzierung wurde entweder bei den Firmen SequiServe (Vaterstetten) oder Macrogen (Seoul, Südkorea) in Auftrag gegeben oder selber durchgeführt. Fragmente, die zu groß zum direkten Sequenzieren waren, wurden von den Enden her ansequenziert und anschließend mit Hilfe von internen Primern weiter sequenziert, welche von den bekannten Fragmenten abgeleitet worden waren (Gene Walking).

DNA-Sequenzierung mit dem ALFExpress II

Die selbst durchgeführte DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem ALFExpress II der Firma Amersham Biosciences Europe (Freiburg) im Labor von Professor Knoop. Die Sequenzierplatten und Spacer wurden gründlich mit 1 % SDS, Reinstwasser und Ethanol gesäubert, bevor die Innenseite der oberen Platte an der oberen Kante mit einer Lösung aus 0,2 ml Ethanol; 0,6 µl Bindsilane; 50 µl (v/v) Methanol (10 %) beschichtet wurde. Die Thermoplatte wurde mit 300 µl Repelsilane beschichtet, welches 5-10 min einwirken musste. Anschließend wurde die Platte wieder gründlich mit Ethanol und H₂O gesäubert.

Der Aufbau des Gelträgers erfolgte nach der Anweisung des Herstellers. Anschließend wurde das Gel gegossen. Die Zusammensetzung war folgendermaßen:

6 M Rotiphorese NF-Harnstoff	18,02	g
Long Ranger Gel Solution (50 %)	5	ml (5 %)
10x Rotiphorese NF-TBE	7,5	ml (1,5x)
Temed	25	μl
APS (10 %)	250	μl
Reinstwasser	ad 50	ml

Für die Reaktionsansätze wurde ein Premix des EXCEL-Kits der Firma Amersham Biosciences Europe (Freiburg) angesetzt:

3,5x SequiTherm EXCEL II Sequencing Buffer	7,2	μl
ALF-labeled primer	1	μl (2 pmol)
SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase (5U/μl)	1	μl
DNA	800	fmol
Reinstwasser	ad 17	μl

Für jede Probe wurden vier PCR-Ansätze mit je 2 μl des jeweiligen SequiTherm EXCEL II-LC Termination Mix (A, C, G, oder T) vorbereitet. Anschließend wurden je 4 μl des jeweiligen Premixes zugegeben. Die Kettenabbruchreaktion erfolgte durch PCR. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 12 aufgeführt.

1. Initialdenaturierung	95 °C	5 min
2. Zyklus (30 x)		
Denaturierung	95 °C	30 sec
Primer-Anlagerung	50 °C	15 sec
Elongation + Kettenabbruch	70 °C	1 min
3. Lagerung	4 °C	endlos

Tab. 12: Verwendetes PCR-Programm für die DNA-Sequenzierung. In die PCR-Produkte werden Didesoxynukleotide eingebaut, die zu einem Kettenabbruch führen.

Die Proben wurden mit 3 μl Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Während die Elektrophorese über Nacht lief, passierten die DNA-Fragmente einen Laser, der die Fluoreszenz maß, welche wiederum von einem Computer in die DNA-Sequenz umgerechnet wurde.

2.16 Sequenzanalysen

Sowohl DNA- als auch Protein-Sequenzanalysen erfolgten über frei im Internet verfügbare Programme. Das DNA-Analyse-Programm DNASIS der Firma (Hitachi Software Engineering, Yokohama/Japan) stand im Institut zur Verfügung.

2.16.1 DNA-Sequenzanalyse

Sequenzvergleiche wurden mit dem Computerprogramm BioEdit (Ibis Therapeutics, Carlsbad/CA, USA) durchgeführt. Dieses Programm diente auch dazu, Promotorelemente aufzufinden. Für das Vergleichen mehrerer Sequenzen bediente sich dieses Programm des ClustalX-Algorithmus (Thompson *et al.*, 1997). Verschiedene Parameter der Sequenzen wie z. B. GC-Gehalt, Codon-Usage und offene Leserahmen wurden über DNASIS ermittelt. Um DNA-Sequenzen mit einer pilzlichen Datenbank zu vergleichen, wurde das Programm NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1990) verwendet.

2.16.2 Protein-Sequenzanalyse

Das Umschreiben von DNA-Sequenzen in Proteinsequenzen wurde im Computerprogramm BioEdit (Ibis Therapeutics, Carlsbad/CA, USA) durchgeführt. Introns wurden gegebenenfalls durch Sequenzvergleiche ausfindig gemacht und vor dem Umschreiben aus den Sequenzen entfernt. Sequenzvergleiche zwischen Proteinsequenzen wurden ebenfalls mit dem Programm BioEdit und dem ClustalX Algorithmus durchgeführt. Um Proteinsequenzen mit einer pilzlichen Datenbank zu vergleichen, wurden die Programme BLAST (NCBI, Altschul *et al.*, 1990) oder Fasta (EMBL, Pearson & Lipman, 1988) verwendet. Ein Hydrophobizitätsplot der Proteine nach Kyte-Doolittle (1982) wurde mit Hilfe des BioEdit-Programms erstellt, die Signalsequenzen wurden mit Hilfe der Computerprogramme SignalP und SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2004) aufgespürt. Das Programm Psort (Horton & Nakai, 1997) wurde verwendet, um die wahrscheinliche Lokalisation von Lacc1 und Lacc2 zu ermitteln.

2.16.3 Hinterlegung der Sequenzinformation

Die Laccasegensequenzen wurden in der Datenbank des National Center for Biotechnological Information (NCBI) hinterlegt, um sie der Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Dort erhielten sie die Zugangsnummern AY351908 (*lacc1*), AY351908 (*lacc2*), DQ060098 (*lacc3*) und DQ060099 (*lacc4*).

2.17 Chemikalien, Materialien, Computerprogramme

Verwendete Salze und Pufferbestandteile

Folgende Salze wurden von VWR International GmbH, Darmstadt bezogen: Ammoniumthiocyanat, CoCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , H_3BO_3 , Kaliumacetat, KOH, Maleinsäure, MgCl_2 , MnCl_2 , MnSO_4 , Natriumacetat, Na_2HPO_4 , Natriumcitrat.

Folgende Salze wurden von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe bezogen: CaCl_2 , Zitronensäure, EDTA, Guanidiniumthiocyanat, KCl, KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaCl, NaOH, PIPES, Tris.

Von anderen Firmen wurden bezogen:

EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycin	Bio-Rad, Hercules CA/USA
KNO_3	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Lithiumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
LiCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tricin	ICN Biomedicals, Aurora, OH/USA

Medienbestandteile und Zusätze

Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
IPTG	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PDA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tetracyclin	Fluka, Buchs/Schweiz
Trypton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
XGal	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Detergenzien

Die verwendeten Detergenzien SDS, Triton X-100, Tween 20 wurden von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe bezogen.

Farbstoffe und Laccasesubstrate

ABTS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenol Blau	Fluka, Buchs/Schweiz
Coomassie Brilliant Blue G250	Bio-Rad, Hercules/CA, USA
DAN, DHN, DMOP, L-DOPA, Tyrosin	Fluka, Buchs/Schweiz
Xylen Cyanol FF	VWR International GmbH, Darmstadt

Lösungsmittel, Alkohole, Säuren und Laugen

Borsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glyzerin	VWR International GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
P/C/I-Gemisch (50:49:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Gelelektrophorese

Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
APS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese Lösung A und B	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiload-Probenpuffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Temed	Fluka, Buchs/Schweiz

Transformation und RNase-Inhibitoren

DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMSO	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Southern und Western Blot

Alkalische Phosphatase-Antikörper	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Kaninchen-AP-Konjugat	Promega, Madison/WI, USA
BCIP/NBT-Lösung (Southern)	Roche Diagnostics, Mannheim
BCIP/NBT-Lösung (Western)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Blockierungslösung	Roche Diagnostics, Mannheim
Dig Easy Hyb	Roche Diagnostics, Mannheim
Magermilchpulver	Sucofin®, TSI GmbH Co. KG, Zeven

DNA-Sequenzierung

Long Ranger Gel Solution	BMA, Rockland/ME, USA
PlusOne Bindsilane	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
PlusOne Repelsilane	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Rotiphorese NF-Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese NF-TBE (10x)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Größenmarker, Enzyme und PCR

1-kb-Marker Gene Ruler	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100-bp-Marker	New England BioLabs Inc., Beverly/MA, USA
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Fluka, Buchs/Schweiz
RNase-Inhibitor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynucleotide Kinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme von MBI Fermentas, St. Leon-Rot:	<i>Bam</i> HI, <i>Cfr</i> 9I, <i>Hind</i> III, <i>Eco</i> RI, <i>Mst</i> I, <i>Not</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Bsp</i> 68I, <i>Ecl</i> 136II, <i>Pdi</i> I
Restriktionsenzyme von BD Biosciences, Heidelberg:	<i>Stu</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Dra</i> I, <i>Eco</i> RV
Restriktionsenzyme von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim:	<i>Apa</i> LI, <i>Avi</i> II, <i>Pst</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Sph</i> I

PCR

Advantage-GC Genomic PCR	BD Biosciences, Heidelberg
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GC-Rich PCR-System	Roche Diagnostics, Mannheim
High Fidelity Enzym-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -Polymerase (rekombinant)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -Polymerase (rekombinant)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Plasmide

pBlueScript SK (+)	Stratagene, La Jolla/CA, USA
pGem-T Easy	Promega, Madison/WI, USA
pUC18	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Verwendete Kits

DNA Extraction Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Dynal K	Dynal A. S., Oslo/Norwegen
Excel Sequenzier-Kit	Amersham Biosciences, Hercules/CA, USA
FASTDNA	Qbiogene, Carlsbad/CA, USA
PCR Dig Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelelutionskit	Qiagen, Hilden
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Verwendete Membranen und Filter

Biodynal-Filter für Plaque Assay	Pall, Dreieich
Hybond-N+ (Southern Blot)	Amersham Biosciences, Hercules/CA, USA
Microcon-Säulchen	Millipore, Bedford/MA, USA
Micropure	Millipore, Bedford/MA, USA
Nitrocellulosemembran (Western Blot)	Schleicher & Schuell, Dassel

Computergestützte Programme

BioEdit	Ibis Therapeutics, Carlsbad/CA, USA www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
Codon Usage	www.kazusa.or.jp/codon/
DNASIS	Hitachi Software Engineering, Yokohama/Japan www.oligo.net/dnasis.htm
FASTA	www.ebi.ac.uk/fasta33/
NCBI Blast	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Oligonucleotide Properties Calculator	www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html
Psort	http://psort.nibb.ac.jp/form2.html
SignalP	www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SecretomeP	www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP-1.0/

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis einer Laccase von *Hortaea acidophila*

Vor einer molekularbiologischen Untersuchung der Laccasegene von *Hortaea acidophila* sollte überprüft werden, ob eine Laccase auf Proteinebene nachzuweisen ist. Dabei sollte nach einem Enzym mit typischen Eigenschaften einer Laccase gesucht werden. Dazu gehören eine extrazelluläre Lokalisation, ein bestimmtes Substratspektrum, oxidative Aktivität und Kupferabhängigkeit. Obwohl der letztendliche Beweis, dass es sich bei einem Enzym um eine Laccase handelt, erst durch vollständige Charakterisierung des aufgereinigten Enzyms möglich wird, kann davon ausgegangen werden, dass ein Enzym mit den genannten Merkmalen mit großer Wahrscheinlichkeit eine Laccase ist.

3.1.1 Nachweis einer Oxidase im Plattentest

Zum Nachweis einer extrazellulären Oxidase wurde *H. acidophila* auf ABTS-haltigem Festmedium angezogen. Nach Anwachsen der Zellen bildete sich ein grüner Hof um die Kolonien, da das ABTS von der von dem Pilz ausgeschiedenen Oxidase oxidiert wurde (Abb. 10).



Abb. 10: ABTS-Oxidation durch *H. acidophila*. Der Pilz wurde auf Festmedium mit ABTS angezogen. Der grüne Hof um die schwarzen Kolonien stammt vom oxidierten ABTS.

3.1.2 Beteiligung der Oxidase an der Melaninsynthese

Laccasen sind häufig an der Synthese von DHN-Melanin beteiligt. Um zu überprüfen, ob die extrazelluläre Oxidase aus *H. acidophila* ebenfalls eine Rolle bei der Melaninsynthese spielt, wurde untersucht, ob die Synthese gestört werden kann, indem dem Enzym ein alternatives Substrat zur Oxidation angeboten wird. Dafür wurden die Zellen mit 0,1 % und 0,2 % Ascorbinsäure auf komplexem Anzuchtmedium für 7 Tage angezogen. Als Indikatoren für Wachstum und Melaninsynthese dienten eine Trübung des Mediums bzw. eine Schwarzfärbung der Kultur. Am 7. Tag wurde das Trockengewicht der Kultur bestimmt. Als Positivkontrolle diente eine Kultur ohne Ascorbinsäure. Da sich herausstellte, dass *H. acidophila* auf Anzuchtmedium mit

0,2 % Ascorbinsäure auf Grund der fehlenden Schutzwirkung des Melanins nicht wuchs, wurden verschiedene Stressfaktoren wie niedriger pH, Lichteinwirkung und die hohe Kupferkonzentration des Mediums nacheinander eliminiert.

Hemmung der Oxidase durch Ascorbinsäure

Die Zugabe von Ascorbinsäure zum Anzuchtmedium verhinderte die vollständige Melaninbildung von *H. acidophila*, wie sich an der Weißfärbung der Kulturen erkennen ließ (Abb. 11). Diese Hemmung war reversibel, da die Zellen nach Verbrauch der zugegebenen Ascorbinsäure oder bei Abzentrifugation und Entfernung des Mediums sofort schwarz wurden. Wurde Ascorbinsäure zu komplexem Anzuchtmedium mit hohen Kupferkonzentrationen gegeben (250 μM), so wurde ein Wachstum der Kultur verhindert.



Abb. 11: Färbung der *H. acidophila*-Kulturen nach 4 Tagen bei Anzucht auf Komplexmedium ohne Ascorbinsäure (links), mit 0,2 % Ascorbinsäure und 0,04 μM Kupfer (mitte) und mit 0,2 % Ascorbinsäure und 250 μM Kupfer (rechts). Das Wachstum auf Anzuchtmedium war bei hohen und niedrigen Kupferkonzentrationen vergleichbar, wenn keine Ascorbinsäure zugegeben wurde. Bei Anzucht mit viel Kupfer und Ascorbinsäure war kein Wachstum zu erkennen, bei verringerter Kupferkonzentration war dagegen eine deutliche Trübung sichtbar. Nach circa 4 Tagen Wachstum war die Ascorbinsäure verbraucht und die Kultur wurde schwarz.

Schutzwirkung des Melanins

Da *H. acidophila* in komplexem Anzuchtmedium mit Ascorbinsäure und hoher Kupferkonzentration nicht wuchs, war davon auszugehen, dass das in die Zellwand eingelagerte Melanin eine Schutzwirkung gegen hohe Kupferkonzentrationen ausübte. Um zu überprüfen, ob Melanin die Zellen auch gegen andere Stressfaktoren schützt, wurde *H. acidophila* in Medium mit hohen Kupferkonzentrationen und Ascorbinsäure angezogen, wobei einmal der pH-Wert auf 5,5 erhöht wurde und einmal das Wachstum im Dunkeln erfolgte (Tab. 13, Abb. 12). Zusätzlich erfolgte die Anzucht in Medium mit Ascorbinsäure und niedriger Kupferkonzentration unter ansonsten normalen Bedingungen, also im Tageslicht und einem pH-Wert von 3,5. Dabei zeigte sich, dass melaninlose Hefezellen nur wuchsen, wenn die Kupferkonzentration deutlich verringert wurde (von 250 μM auf 0,04 μM), während die Abdunklung der Kultur und die Erhöhung des pH-Wertes bei gleichzeitig hoher Kupferkonzentration kein Wachstum ermöglichten.

Tab. 13: Einfluss von Stressfaktoren auf Wachstum und Melanisierung von *H. acidophila* bei Hemmung der Melaninsynthese durch Zugabe von Ascorbinsäure. Die Positivkontrolle wurde mit viel Kupfer (250 μM) und ohne Ascorbinsäure, die Negativkontrolle mit viel Kupfer und 0,2 % Ascorbinsäure angezogen. Um den Einfluss der Stressfaktoren (niedriger pH-Wert, hohe Kupferkonzentration und Lichteinwirkung) zu untersuchen, wurden die Zellen wie die Negativkontrolle angezogen, nur dass jeweils ein Stressfaktor ausgeschaltet wurde. Zu Wachstum kam es nur bei der Positivkontrolle und wenn bei Ascorbinsäurezugabe die Kupferkonzentration stark verringert wurde (0,04 μM). - = kein Wachstum, ☺ = Wachstum ohne Melanisierung, ☺ = Wachstum mit leichter Melanisierung, ☺☺ = Wachstum mit deutlicher Melanisierung

Tag	Positivkontrolle	Negativkontrolle	Im Dunkeln	pH 5,5	Niedr. Kupferkonzentration
2	☺	-	-	-	☺
3	☺	-	-	-	☺
4	☺☺	-	-	-	☺
7	☺☺	-	-	-	☺☺

Zur besseren Quantifikation des in Tabelle 13 nur schematisch dargestellten Wachstums wurde das Trockengewicht der verschiedenen Kulturen bestimmt (Abb. 12).

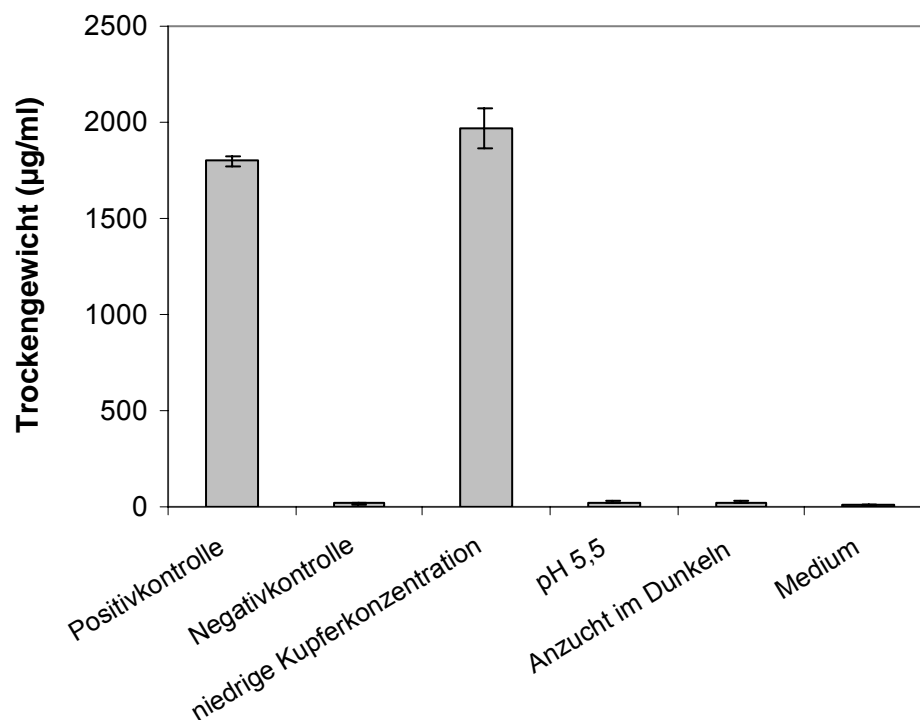


Abb. 12: Trockengewicht der *H. acidophila*-Kulturen nach 7 Tagen Wachstum unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Das Trockengewicht bezieht sich auf die in Tabelle 13 beschriebenen Kulturen. Bei Wachstum auf Anzuchtmedium mit verringerter Kupferkonzentration wuchs *H. acidophila* bei Zugabe von 0,2 % Ascorbinsäure genauso gut wie die Positivkontrolle ohne Ascorbinsäure. Bei hoher Kupferkonzentration kam es dagegen zu keinem Wachstum, wenn Ascorbinsäure hinzugegeben wurde (Negativkontrolle), auch dann nicht, wenn die Anzucht im Dunkeln oder bei nur schwach saurem pH-Wert von 5,5 oder 6,5 durchgeführt wurde. Zur Kontrolle wurde das Trockengewicht von unbeimpftem Medium bestimmt.

3.1.3 Lokalisation der Oxidase

Der ABTS-Plattentest (Abb. 10) ließ den Schluss zu, dass die nachgewiesene Oxidase extrazellulär lokalisiert war. Um zu untersuchen, ob das Enzym frei im extrazellulären Raum oder mit der Zellwand assoziiert vorlag, wurde *H. acidophila* über 10 Tage bei 22 °C angezogen. Täglich wurde die Oxidaseaktivität im Kulturüberstand und an den Zellen gemessen (Abb. 13). Es konnte Oxidaseaktivität sowohl im Kulturüberstand als auch mit den Zellen assoziiert nachgewiesen werden, wobei die Aktivität an den Zellen insgesamt höher war als im Überstand (maximal etwa 25 mU/ml im Gegensatz zu maximal etwa 10 mU/ml) und schneller anstieg. Die maximale Aktivität wurde an den Zellen nach 6-7 Tagen erreicht, im Überstand erst nach 8-9 Tagen.

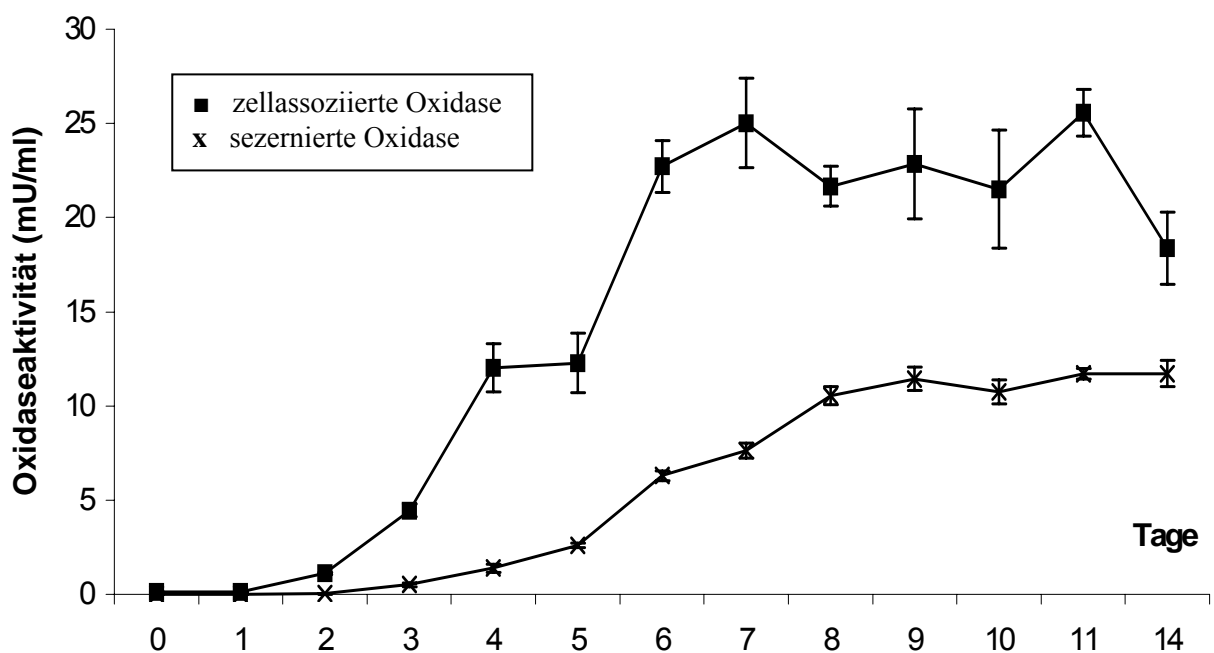


Abb. 13: Oxidaseaktivität im Kulturüberstand und an den Zellen von *H. acidophila*. Während 10tägiger Anzucht bei 22 °C wurde täglich die Oxidaseaktivität bestimmt. Die Enzymaktivität wurde mit ABTS bestimmt und bezieht sich auf 1 ml Hefekultur.

3.1.4 Kupferabhängigkeit der Oxidase

Laccasen benötigen Kupfer, um katalytisch aktiv zu sein. Zudem kann die Expression von Laccasegenen bei einigen Organismen durch Zugabe von Kupferionen induziert werden. Während für die Synthese von funktionsfähiger Laccase bereits wenig Kupfer im Medium ausreichen sollte, würde eine weitere Steigerung der Aktivität bei erneuter Zunahme der Kupferkonzentration auf eine kupferabhängige Induktion der Genexpression hinweisen.

Um zu überprüfen, ob eine Kupferabhängigkeit der untersuchten Oxidase vorliegt, wurde ein Anzuchtmedium verwendet, dem kein Kupfer zugegeben wurde. Verunreinigungen mit Spuren von Kupfer durch das im Medium enthaltene Trypton konnten nicht ausgeschlossen werden, da die Verwendung eines Minimalmediums mit anorganischer Stickstoffquelle auf Grund des

schlechten Wachstums von *H. acidophila* in Flüssigkultur mit diesem Medium nicht möglich war (nicht gezeigt). Zusätzlich zu dem Medium ohne Kupfer wurde Medium verwendet, das wenig Kupfer ($0,04 \mu\text{M}$) und viel Kupfer ($250 \mu\text{M}$) enthielt. Die $250 \mu\text{M}$ Kupfer entsprachen der Kupferkonzentration im Standardanzuchtmedium. Untersucht wurde nur die im Kulturüberstand lokalisierte Oxidase.

Bei Anzucht in Medium ohne Kupfer wurde so gut wie keine Oxidaseaktivität gemessen, obwohl Zellwachstum nachweisbar war (Abb. 14). Bei niedriger Kupferkonzentration lag die Aktivität bei circa 2 mU/ml und stieg noch einmal auf das 4fache bei hoher Kupferkonzentration. Das Wachstum verbesserte sich bei Anwesenheit von Kupfer im Medium, sank jedoch bei hohen Kupferkonzentrationen wieder ab.

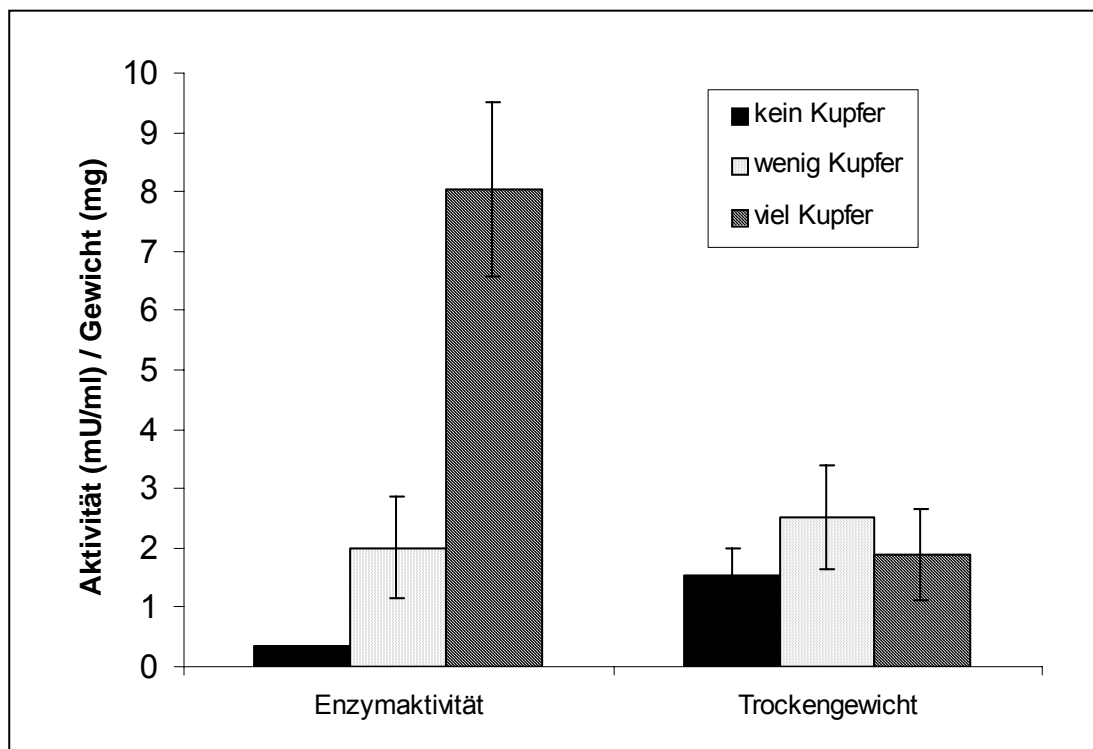


Abb. 14: Oxidaseaktivität in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration. Nach 7 Tagen Wachstum auf komplexem Anzuchtmedium wurde die Oxidaseaktivität im Überstand bestimmt. Die Kupferkonzentration betrug entweder $0,04 \mu\text{M}$ (wenig) oder $250 \mu\text{M}$ (viel). Durch Trypton ins Medium eingetragene Spuren von Kupfer, wurden vernachlässigt. Die Enzymaktivität wurde mit dem künstlichen Laccasesubstrat ABTS bestimmt und bezieht sich ebenso wie das Trockengewicht auf 1 ml Hefekultur.

3.1.5 Substratspektrum der Oxidase

Die verwendeten Substrate wurden fotometrisch bzw. mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode auf ihre Oxidierbarkeit durch die im Überstand lokalisierte Oxidase von *H. acidophila* überprüft. Während Diamino- und Dihydroxynaphthalin, Ascorbinsäure und Dimethoxyphenol oxidiert wurden, fand keine Oxidation von Syringaldazin, Tyrosin und Dihydroxyphenol statt (Tab. 14). Die Oxidationsversuche wurden von Dipl.-Biol. Jutta Bend durchgeführt, doch die Ergebnisse

werden hier aufgeführt, da sie einen wichtigen Hinweis auf den Laccasecharakter der Oxidase lieferten.

1,8-Diaminonaphthalin	+
Acorbinsäure	+
1,6-Dihydroxynaphthalin	+
Dimethoxyphenol	+
Syringaldazin	-
Tyrosin	-
Dihydroxyphenol (DOPA)	-

Tab. 14: Von der *H. acidophila*-Oxidase oxidierte (+) und nicht-oxidierte (-) Substrate. Die Oxidation wurde fotometrisch oder an Hand des Sauerstoffverbrauchs mit einer Sauerstoffelektrode nachgewiesen. Verwendet wurde nicht aufgereinigte Oxidase aus dem konzentrierten Kulturüberstand (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

3.1.6 Nachweis über laccasespezifische Antikörper

Es wurden zwei polyklonale laccasespezifische Antikörper verwendet, um im Kulturüberstand und im Zellextrakt Laccasen nachzuweisen (Abb. 15). Ein Antikörper richtet sich gegen die Laccase des Basidiomyceten *Ceriporiopsis subvermispora*, der andere gegen die Laccase des Ascomyceten *Melanocarpus albomyces*. Eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an Proteine aus den Proben wurde durch Kontrollexperimente ohne Primärantikörper ausgeschlossen.

Der Antikörper gegen die Laccase aus *M. albomyces* erkannte sowohl in der Überstandsfraction als auch in der Zellaufschlussfraction ein Protein, das ein Molekulargewicht von circa 70 kDa aufwies. Der Antikörper gegen die Laccase aus *C. subvermispora* markierte im Überstand ein Protein mit einem Molekulargewicht von zwischen 35 kDa und 40 kDa (Abb. 15, unterer Pfeil) und im Zellaufschluss eines von circa 55 kDa (Abb. 15, oberer Pfeil). Da der verwendete Marker keine exakte Größenermittlung zulässt, handelt es sich hierbei nur um ungefähre Größenangaben. Die dunklen Flecken im oberen Bereich der Membran stammen vom Melanin, das im Gel mit aufgetrennt wurde.

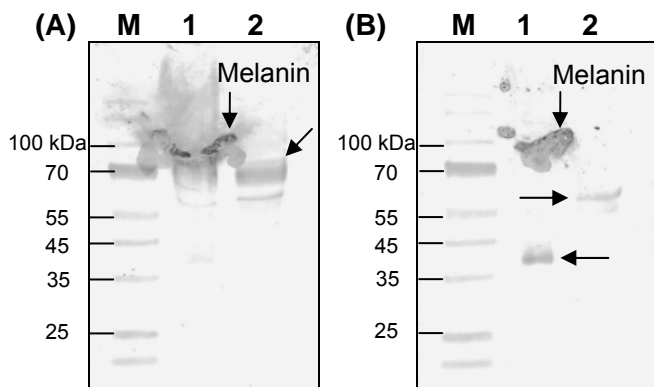


Abb. 15: Immunologischer Nachweis der Laccasen im Überstand und im Zellaufschluss. Die Laccasen wurden mit polyklonalen Antikörpern nachgewiesen, die spezifisch für die Laccasen von *M. albomyces* (A) oder *C. subvermispora* (B) sind. Aufgetragen wurden 20 µl konzentrierter Kulturüberstand (1) und 10 µl Zellextrakt (2).

3.2 Nachweis der Laccasegene von *H. acidophila*

Nachdem es auf proteinbiochemischer und enzymatischer Ebene ausreichend Hinweise für die Existenz einer oder mehrerer Laccasen bei *H. acidophila* gab, sollten die dazugehörigen Gene nachgewiesen werden. In einem ersten Schritt wurden Methoden ausgearbeitet, um Nukleinsäuren aus *H. acidophila* zu isolieren. Nachdem genomische DNA zur Verfügung stand, wurde eine PCR mit laccasespezifischen Primern durchgeführt.

3.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus *H. acidophila*

Da in dieser Arbeit erstmalig molekularbiologisch mit *H. acidophila* gearbeitet wurde, mussten Methoden zur Isolierung von genomischer DNA etabliert werden, um die Existenz von Laccasegenen nachweisen zu können. Zusätzlich wurden Versuche zur Isolierung von RNA durchgeführt, da für eine spätere heterologe Expression die cDNA der Gene zur Verfügung stehen muss.

Isolierung genomischer DNA

Es wurden verschiedene Methoden zur Isolierung genomischer DNA von *H. acidophila* verwendet. Das kommerziell erhältliche FASTPrep-Kit zur Isolierung von genomischer DNA aus Pilzen wurde gemäß der Anleitung des Herstellers angewendet, eignete sich jedoch nicht zur Extraktion von DNA aus *H. acidophila*, da die DNA nicht an die verwendete Bindematrix band (nicht gezeigt). Genomische DNA konnte schließlich mit zwei anderen Methoden extrahiert werden (Abb. 16). Bei der Methode zur Isolierung von genomischer DNA aus filamentösen Pilzen wurden die Zellen mit Hilfe von Flüssigstickstoff aufgeschlossen, bei der Methode zur DNA-Isolierung aus Hefen fand der Zellaufschluss durch Glaskügelchen in Verbindung mit mechanischer Einwirkung auf die Zellen statt. Für die DNA-Isolierung wurden *H. acidophila*-Zellen in komplexem Anzuchtmedium ohne und mit 0,2 % Ascorbinsäure angezogen. Da Melanin den Zellaufschluss erschwert, wurde überprüft, inwieweit sich Zellen, deren Melaninsynthese durch Ascorbinsäure gehemmt ist, zur Extraktion von Nukleinsäuren eignen.

Die DNA-Ausbeute lag bei 200-400 µg/ml für die hefespezifische Aufschlussmethode, wobei die auf Ascorbinsäure angezogenen Hefen nur unerheblich mehr DNA lieferten. Die Aufschlussmethode für filamentöse Pilze lieferte 500-1000 µg/ml DNA, wenn die Hefe ohne Ascorbinsäure angezogen worden war und nur 100 µg/ml DNA bei Anzucht mit Ascorbinsäure. Zudem war die genomische DNA desto intakter, je weniger mechanischer Stress während des Aufschlusses auf die Zellen ausgeübt wurde, wie an der Höhe der Banden zu

erkennen ist (Abb. 16). Hier musste ein Kompromiss zwischen einem effektiven Aufschluss der durch Melanineinlagerung stabilisierten Zellwände und der Zerstörung der DNA auf Grund von Scherkräften gefunden werden. Ausgewählt wurde die Aufschlussmethode für Hefezellen, da diese einfacher durchzuführen war als die für filamentöse Pilze spezifische Methode und reinere DNA lieferte. Auf die Anzucht mit Ascorbinsäure wurde verzichtet, da die Zellen sich schlecht abernten ließen und die DNA-Ausbeute auf Grund des schlechteren Wachstums der Kulturen trotz des verbesserten Zellaufschlusses insgesamt nicht höher war.

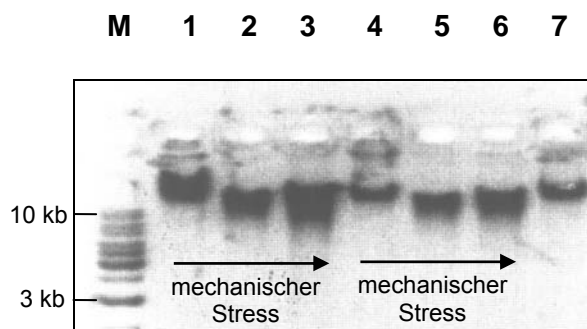


Abb. 16: Genomische DNA nach Isolierung mit verschiedenen Methoden. Spuren 1-3: 5 µl DNA-haltige Lösung nach hefezellspezifischer Extraktion bei Anzucht der Zellen ohne Ascorbinsäure. Spuren 4-6: wie 1-3 aber Anzucht mit Ascorbinsäure. 1,4: Aufschluss mit 2 min Vortexen, 2,5: Aufschluss mit 20s im Ribolyser, 3,5: Aufschluss mit 30s im Ribolyser, Spur 7: 10 µl DNA-haltige Lösung nach für filamentöse Pilze spezifische Extraktion bei Anzucht mit Ascorbinsäure. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Isolierung von RNA

Es wurden verschiedene Methoden zur RNA-Isolierung verwendet, von denen jedoch keine erfolgreich war. Zuerst wurde versucht, die mRNA über die Bindung des PolyA-Schwanzes an eine Bindematrix aufzureinigen. Isolierte mRNA kann auf Grund der geringen Konzentration nicht im Agarosegel nachgewiesen werden, so dass der Nachweis über cDNA-Synthese mit anschließender PCR erfolgen muss. Ein Nachweis von laccasespezifischer cDNA über eine PCR mit laccasespezifischen Primern war nicht erfolgreich. Daraufhin wurde nach der cDNA-Synthese ein Teil des Ansatzes mit Ethidiumbromid versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Da das Ethidiumbromid in die entgegengesetzte Richtung läuft wie die cDNA, sollte sich angefärbte cDNA im Gel erkennen lassen. Mit dieser Methode ließ sich abschätzen, dass cDNA synthetisiert worden war.

Aus diesem Grund wurden Primer zur Amplifikation von Fragmenten verschiedener Haushaltsgene in die PCR eingesetzt. Verwendet wurden Primer, die bereits in der Arbeitsgruppe vorlagen und die jeweils ein Fragment der Gene der Phosphoglucokinase (PGK), der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPD) und der ATPase amplifizieren sollten. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Primer zur Amplifikation eines Fragments des β -Aktins abgeleitet. Diese Primer wurden zuerst in einer PCR mit genomischer DNA von *H. acidophila* getestet. Die für die Gene der PGK, GPD und ATPase spezifischen Primer lieferten in der PCR kein

Signal, unabhängig davon wie die Bedingungen variiert wurden. Die Primer für das PGK-Gen erzeugten jedoch ein Signal bei Verwendung der DNA von *Trichoderma atroviride*. Die β -Aktin-Primer amplifizierten ein Fragment der erwarteten Größe von etwa 630 bp auf *H. acidophila*-DNA (Abb.17, Pfeil oben). Dieses Signal war jedoch sehr schwach. Auf *Trichoderma*-DNA wurde ein kleineres Fragment amplifiziert (Abb.17, Pfeil unten). Die β -Aktin-Primer wurden auch in eine PCR mit cDNA eingesetzt, jedoch ohne Erfolg.

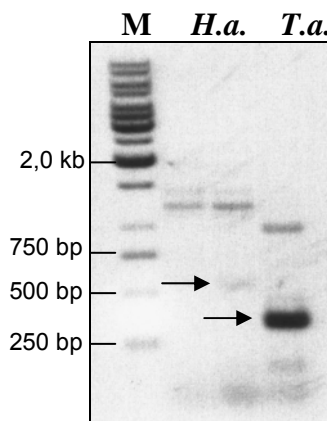


Abb. 17: PCR auf genomischer DNA mit den Haushaltsgen-Primern für β -Aktin. Verwendet wurde genomische DNA von *H. acidophila* (*H.a.*) und von *T. atroviride* (*T.a.*). Die Primer-anlagerungstemperatur betrug 45 °C. Je 5 μ l Reaktionsansatz wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Für *H. acidophila* wurden zwei Ansätze aufgetragen. Die Pfeile kennzeichnen die spezifischen Amplifikate. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Zusätzlich wurden verschiedene Methoden zur Isolierung von Gesamt-RNA verwendet, die für *Saccharomyces spec.* etabliert sind. Diese Methoden haben den Vorteil, dass die RNA im Agarosegel nachgewiesen werden kann, da vor allem die ribosomale RNA in hoher Konzentration isoliert wird. Zwei distinkte Banden bei etwa 1,9 kb (18S RNA) und 5,0 kb (28S RNA) sind nachweisbar, wenn intakte RNA isoliert wurde, sowie einige kleinere Banden, die tRNAs und hnRNA enthalten. Die mRNA ist im Agarosegel nicht sichtbar, da sie nur circa 2 % der Gesamt-RNA ausmacht und sich dabei auf verschiedene Größen verteilt.

Bei allen getesteten Methoden zur Isolierung von Gesamt-RNA stellte sich heraus, dass eine große Menge an genomischer DNA miteluiert wurde. Diese konnte jedoch durch Lithium-acetat-Fällung und DNase-I-Spaltung beseitigt werden. Problematisch war dagegen die starke Degradation der RNA (Abb. 18), die trotz schnellem und sauberem Arbeiten nicht verhindert werden konnte. Dieser Abbau war bei der Verwendung von selbst angesetztem Trizol-Reagenz sogar noch stärker als bei Verwendung eines Phenol-Chloroform-Gemischs zur Extraktion, obwohl nach Angaben der Hersteller das Trizolreagenz RNasen hemmt. Vor allem die Banden der 18S und 28S RNA wurden vollständig hydrolysiert. Die RNA wurde sowohl auf TAE-Agarosegelen als auch auf denaturierenden RNA-Gelen nachgewiesen. Beide Methoden lieferten die gleichen Ergebnisse.

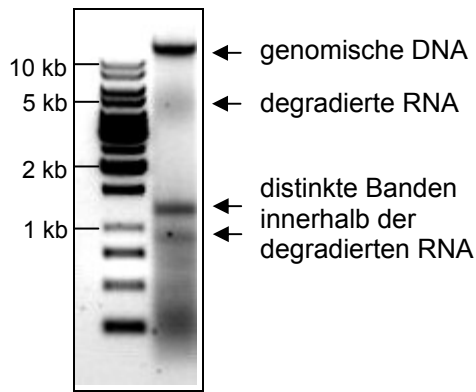
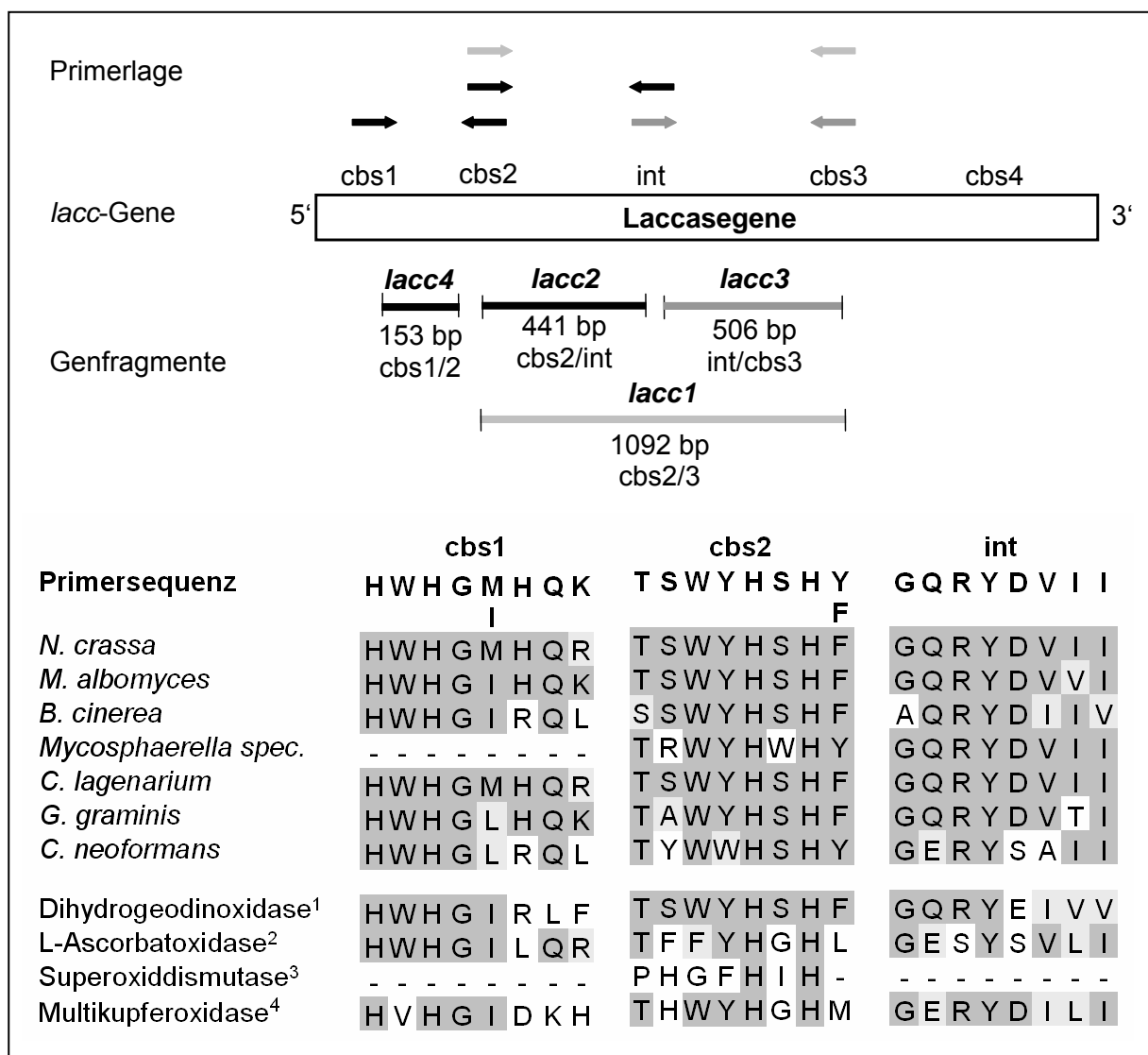


Abb. 18: Nachweis von Gesamt-RNA auf einem TAE-Agarosegel. Die RNA wurde mit Hilfe des Phenol-Chloroform-Gemischs isoliert. Es wurden circa 1,6 µg der Nukleinsäuren aufgetragen. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

3.2.2 Herkunft der cbs-Primer

Zu Beginn der Arbeit wurden Primer für den Laccasegenachweis verwendet, die für Laccasegene aus Weißfäulepilzen (d'Souza *et al.*, 1996) spezifisch waren und solche, die ausgehend von der Dihydrogeodinoxidase aus *Aspergillus terreus* (Dohse, 2001), einem Kupferbindeprotein wie die Laccase, abgeleitet worden waren. Da diese Primer für *H. acidophila*-DNA keine brauchbaren Ergebnisse lieferten, wurden mit Hilfe von Sequenzvergleichen neue für ascomycetische Laccasen spezifische Primer abgeleitet. Für die Sequenzvergleiche wurden Laccasesequenzen herangezogen, die auf Proteinebene in der NCBI-Datenbank hinterlegt waren. Ausgewählt wurden sechs ascomycetische und eine basidiomycetische Laccase, die wahrscheinlich zur Melaninsynthese dienen (Abb. 19). Zur Kontrolle der Spezifität der Primer wurden die Sequenzen von vier Kupferbindeproteinen, die keine Laccasen sind, herangezogen. Es handelt sich dabei um die Dihydrogeodinoxidase aus *Aspergillus terreus*, eine Superoxiddismutase aus dem Bakterium *Clostridium tetani*, eine Multikupferoxidase aus dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und die L-Ascorbatoxidase aus der Zucchini (*Cucurbita pepo*). Alle vier Kupferbinderegionen (cbs) wurden für die Ableitung von Primern verwendet, obwohl cbs1 im Gegensatz zu cbs2-4 nur über einen kleinen Bereich deutlich konserviert war. Die Primer wurden wenn möglich so konstruiert, dass sie auf Laccasen deutlich besser passen als auf andere Kupferbindeproteine. Generell muss auf Grund der hohen Konservierung der Kupferbindedomänen bei Verwendung der cbs-Primer mit falschpositiven Signalen gerechnet werden, da auch andere Kupferbindeproteine eine ähnliche Gensequenz in diesen Bereichen besitzen können, wie in Abbildung 19 zu erkennen ist. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Sequenzen gesucht, die bei Laccasen konserviert, aber nicht mit den Kupferbinderegionen assoziiert sind. Insgesamt wurden drei solche Sequenzen gefunden, von denen jedoch nur eine für die Ableitung eines Primers verwendet wurde. Die Sequenz wurde mit int (für interne Sequenz) bezeichnet.

Um die Primer zu konstruieren, musste die Proteinsequenz in die DNA-Sequenz übersetzt werden. Um die alternative Verwendung von Codons für die Kodierung einer bestimmten Aminosäure zu berücksichtigen, wurden Laccasesequenzen verglichen, von denen sowohl die DNA- als auch die Proteinsequenz bekannt ist. So wurde für die Ascomyceten *Colletotrichum lagenarium*, *Neurospora crassa* und *Gaeumannomyces graminis* analysiert, welche Codons in den Laccasegenen zur Kodierung einer bestimmten Aminosäure bevorzugt verwendet werden. Da zu diesem Zeitpunkt aus keiner schwarzen Hefe sowohl Aminosäure- als auch DNA-Sequenz einer Laccase bekannt waren, aber die Möglichkeit bestand, dass die Codon-Präferenz bei *H. acidophila* ähnlich sein würde wie bei anderen schwarzen Hefen, wurde zusätzlich eine Cellulase aus der schwarzen Hefe *Melanocarpus albomyces* zur Untersuchung der Codon-Präferenz herangezogen. Abbildung 19 zeigt neben den Primersequenzen eine schematische Darstellung des Laccasegens mit den Primerbindestellen und den mit Hilfe dieser Fragmente amplifizierten Fragmenten. Diese werden unter 3.2.3 genauer beschrieben.



Primersequenz	cbs3	cbs4
	HP I H L H G	H C H I A W H
<i>N. crassa</i>	HP I H L H G	H C H I A W H
<i>M. albomyces</i>	HP M H L H G	H C H I A W H
<i>B. cinerea</i>	HP I H L H G	H C H I A W H
<i>Mycosphaerella spec.</i>	HP - D L E R	- - - - -
<i>C. lagenarium</i>	HP I H L H G	H C H I A W H
<i>G. graminis</i>	HP M H L H G	H C H I A W H
<i>C. neoformans</i>	HP Y H L H G	H C H I G W H
Dihydrogeodinoxidase ¹	HP I H L H G	H C H L Q Y H
L-Ascorbatoxidase ²	HP W H L H G	H C H I E P H
Superoxiddismutase ³	- - - - -	- - - - -
Multikupferoxidase ⁴	HP F H L H G	H C H L E L H

Abb. 19: Ableitung der Primer cbs1, cbs2, int, cbs3 und cbs4 und schematische Darstellung des Laccasegens mit Primerbindestellen und amplifizierten Fragmenten. Die Primer cbs1-cbs4 wurden von den Kupferbinderegionen 1-4 abgeleitet, der Primer int ist komplementär zu einer in Laccasen hochkonservierten Sequenz, die sich zwischen cbs2 und cbs3 befindet. Die mit diesen Primern amplifizierten Fragmente sind eingezeichnet. Für die Ableitung wurden die Proteinsequenzen von 6 ascomycetischen und einem basidiomycetischen Pilz (*C. neoformans*) verwendet. Als Kontrolle für die Spezifität der Primer wurde die Sequenz von vier weiteren Kupferbindeproteinen untersucht. Die Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms FASTA (Pearson & Lipman, 1988) mit der pilzlichen Proteindatenbank von EMBL verglichen. Außer der Dihydrogeodinoxidase aus *Aspergillus terreus* wurden in allen Fällen nur Laccasen als Treffer angegeben. Die verwendeten Laccasen stammen aus: *Neurospora crassa* (P06811), *Melanocarpus albomyces* (Q70KY3), *Botrytis cinerea* (Q12570), *Mycosphaerella spec.* (Q8J240), *Colletotrichum lagenarium* (Q9C497), *Gaeumannomyces graminis* (Q8TFE2/Q8TFE1), *Cryptococcus neoformans* (Q5KEA0). ¹ *Aspergillus terreus* (BAA08486), ² *Cucurbita pepo* (A51027), ³ *Clostridium tetani* (Q897Y0), ⁴ *Caenorhabditis elegans* (NP_501502). In die schematische Darstellung des Laccasegenes ist die Lage der Primerbindestellen (cbs) eingezeichnet. Es wurden nur Primerkombinationen eingezeichnet (Pfeile), die ein laccasegenspezifisches Fragment amplifizierten. Die Fragmente und ihre Größen sind ebenfalls eingezeichnet.

3.2.3 Amplifikation laccasespezifischer Genfragmente

Um die optimalen PCR-Bedingungen für die einzelnen Primerkombinationen zu bestimmen, wurde eine Gradienten-PCR mit Anlagerungstemperaturen von 54-64 °C durchgeführt. Dieser Temperaturbereich wurde an Hand der errechneten Schmelztemperatur der Primer ausgewählt. Da für die Experimente kein Gradientencycler zur Verfügung stand, wurden PCR-Reaktionen für jede Temperatur separat und für jeden Ansatz mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die erwarteten Fragmentgrößen wurden ausgehend von bekannten Laccasegenen berechnet.

Amplifikation der Genfragmente cbs1/2

Für die mit den Primern cbs1 und cbs2 auf genomischer DNA amplifizierten Laccasegenfragmente wurde eine Größe von zwischen 120 bp und 140 bp errechnet. Obwohl die

PCR-Bedingungen hinsichtlich der Primeranlagerungstemperatur variiert wurden, lieferte keine der getesteten Bedingungen ein Signal.

Amplifikation der Genfragmente cbs1/int

Für die mit den Primern cbs1 und 3'-int auf genomischer DNA amplifizierten Laccasegenfragmente wurde eine Größe von zwischen 750 bp und 900 bp errechnet. Bei Anlagerungstemperaturen zwischen 56 °C und 60 °C traten mehrere Banden zwischen 500 bp und 1500 bp auf, von denen bei 62 °C nur die 500-bp-Bande sichtbar blieb (Abb. 20). Die Banden unterhalb von 500 bp stammen von Primermultimeren. Die 500-bp-Bande entstand jedoch auch in der Einzelprimerkontrolle des Primers 3'-int, so dass von einer unspezifischen Amplifikation auszugehen war. Auch die Bande bei circa 1000 bp ließ sich schwach in der Einzelprimerkontrolle bei 56 °C nachweisen. Der Primer cbs1 lieferte alleine in die PCR eingesetzt bei keiner Anlagerungstemperatur ein Signal (nicht gezeigt). Die einzige interessante Bande war demnach die bei etwa 750 bp (Pfeil), welche auch zu der errechneten Größe passte. Diese Bande wurde deshalb aus dem Gel eluiert und zur Sequenzierung vorbereitet. Die Sequenzanalyse ergab, dass beide Primer gebunden hatten, die Sequenz jedoch keine Ähnlichkeit zu Laccasegenen hatte. Auf Proteinebene bestand die größte Übereinstimmung mit einem hypothetischen, nicht näher charakterisierten Protein aus *Neurospora crassa* und zu einem Kapselprotein aus *Cryptococcus neoformans*.

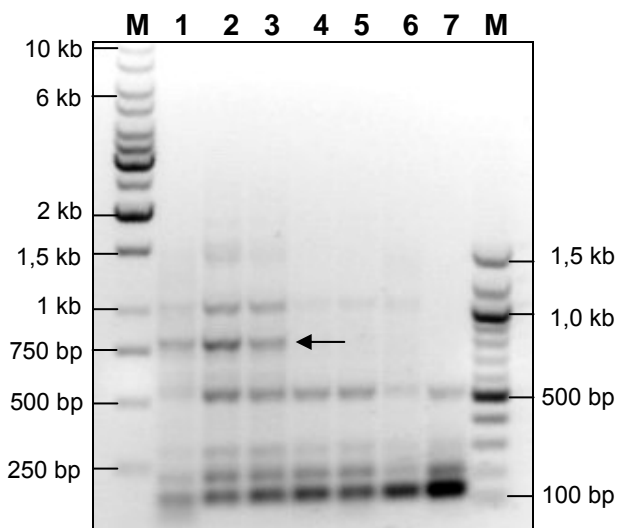


Abb. 20: Amplifikation von Laccasegenfragmenten mit Hilfe der Primer cbs1 und 3'-int. Auf ein 1 %iges Gel wurden pro Spur 5 µl PCR-Ansatz aufgetragen. M = Marker, 1 kb- bzw. 100 bp-Leiter. 1 = 56 °C, 2 = 58 °C, 3 = 60 °C, 4 = 62 °C, 5 = 64 °C, 6 = EPK 3'-int 56 °C, 7 = EPK 3'-int 64 °C, EPK = Einzelprimerkontrolle. Der Pfeil markiert die aus dem Gel eluierte Bande. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Amplifikation der Genfragmente cbs1/3

Für die mit den Primern cbs2 und cbs3 auf genomischer DNA amplifizierten Laccasegenfragmente wurde eine Größe von zwischen 1200 bp und 1400 bp errechnet. In diesem Größenbereich traten bei den Temperaturen von 58-62 °C mehrere Banden auf, von denen eine bei

knapp über 1500 bp sehr deutlich war (Abb. 21). Ein Vergleich mit der Einzelprimerkontrolle des Primers cbs3 zeigte jedoch, dass diese Banden auch hier auftraten. Die Einzelprimerkontrolle wies bei allen Temperaturen die gleichen Banden auf wie die PCR mit cbs1/3, zum Teil sogar mehr Banden, so dass davon auszugehen war, dass keine spezifischen Amplifikate vorlagen. Um auszuschließen, dass ein spezifisches Amplifikat unter der 1500 bp-Bande lag, wurde diese Bande (Pfeil) aus dem Gel eluiert und zur Sequenzierung vorbereitet. Die Sequenzierung ergab jedoch, dass wie erwartet der Primer cbs3 an zwei Stellen an die genomische DNA gebunden hatte.

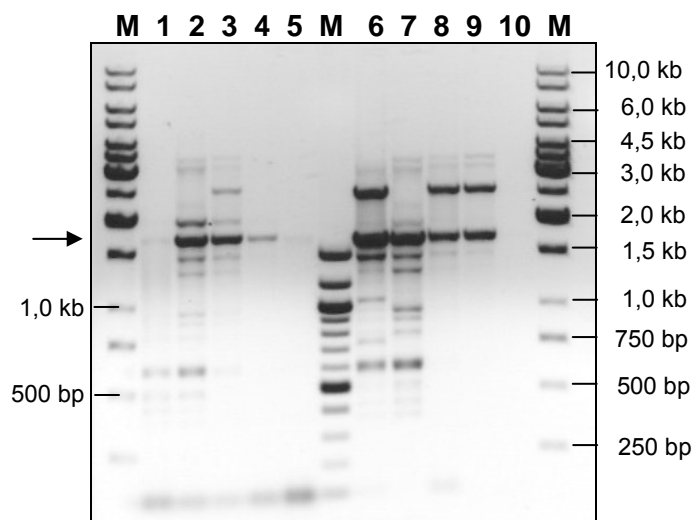


Abb. 21: Amplifikation von Laccasegenfragmenten mit Hilfe der Primer cbs1 und cbs3. Auf ein 1%iges Gel wurden pro Spur 5 µl PCR-Ansatz aufgetragen. M = Marker, 1 kb- bzw. 100 bp-Leiter. 1 = 56 °C, 2 = 58 °C, 3 = 60 °C, 4 = 62 °C, 5 = 64 °C, 6 = EPK cbs3 56 °C, 7 = EPK cbs3 58 °C, 8 = EPK cbs3 60 °C, 9 = EPK cbs3 62 °C, 10 = EPK cbs3 64 °C, EPK = Einzelprimerkontrolle. Der Pfeil markiert die aus dem Gel eluierte Bande. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Amplifikation der Genfragmente cbs1/4

Für die mit den Primern cbs1 und cbs4 auf genomischer DNA amplifizierten Laccasegenfragmente wurde eine Größe von zwischen 1400 bp und 1500 bp errechnet. Obwohl die Primeranlagerungstemperaturen von 54-64 °C variiert wurden, lieferte keine der getesteten Bedingungen ein Signal.

Amplifikation der Genfragmente cbs2/int

Für die mit den Primern cbs2 und 3'-int auf genomischer DNA amplifizierten Laccasegenfragmente wurde eine Größe von zwischen 400 bp und 500 bp errechnet. Es traten mehrere Banden zwischen 250 bp und 1,2 kb auf, die bei Erhöhung der Anlagerungstemperatur nach und nach verschwanden, bis bei 64 °C nur noch eine schwache Bande bei circa 1 kb zu erkennen war. Bei niedrigen Anlagerungstemperaturen traten zwei Banden auf, die ihrer Größe nach zu einem Laccasegen gehören konnten (Abb. 22B, Pfeile). Da diese Banden wie die Hintergrundbanden bei Erhöhung der Anlagerungstemperatur verschwanden, wurde stattdessen die Elongationszeit von 1 min auf 30 s herabgesetzt, um die Amplifikation größerer

Fragmente zu verhindern. Zusätzlich wurde die MgSO_4 -Konzentration von 1,5 mM auf 1 mM herabgesetzt, um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen. Da diese Versuche keine nennenswerte Reduktion des Hintergrundes zur Folge hatten, wurden die Banden bei 450 bp und bei 600 bp aus dem Agarosegel ausgeschnitten und zur Sequenzierung vorbereitet.

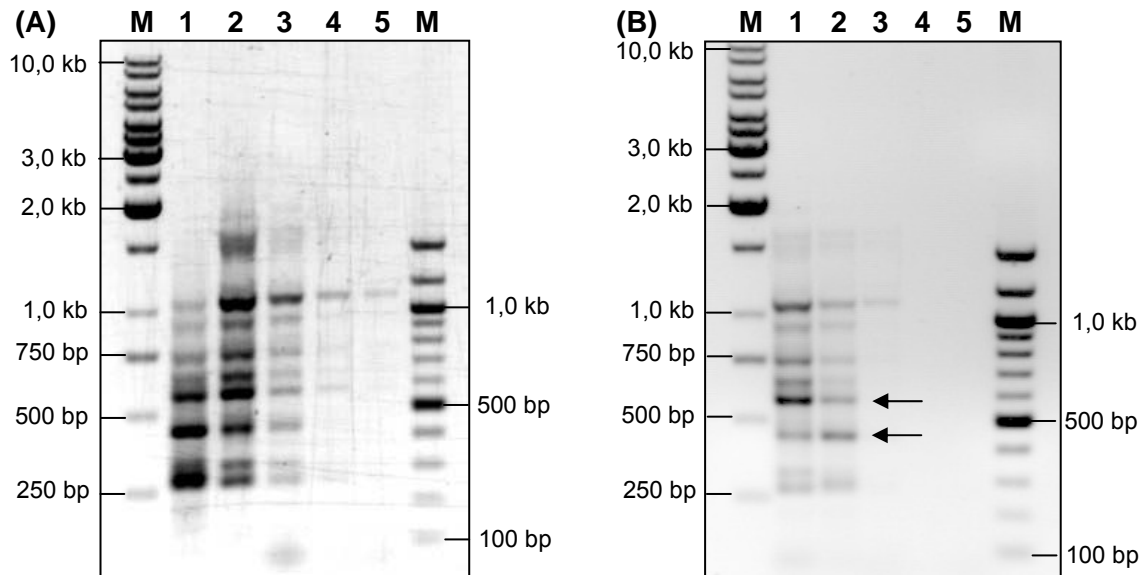


Abb. 22: Amplifikation von Laccasegenfragmenten mit Hilfe der Primer *cbs2* und 3'-int. Auf ein 1 %iges Gel wurden pro Spur 5 μl PCR-Ansatz aufgetragen. M = Marker, 1 kb- bzw. 100 bp-Leiter. (A) 1 = 56 °C, 2 = 58 °C, 3 = 60 °C, 4 = 62 °C, 5 = 64 °C, (B) 1-5: 58 °C, 1 = Probe wie A2, 2 = 30 s t_E , 3 = 30 s t_E , 1 mM MgSO_4 , 4 = EPK *cbs2*, 5 = EPK 3'-int. 30 s t_E = auf 30 s verkürzte Elongationszeit, EPK = Einzelprimerkontrolle. Die Pfeile markieren die aus dem Gel eluierte Bande. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Amplifikation der Genfragmente *cbs2/3*

Für die mit den Primern *cbs2* und *cbs3* auf genomischer DNA amplifizierten Laccasegenfragmente wurde eine Größe von zwischen 850 bp und 1000 bp errechnet. Es traten mehrere Banden bis zu einer Größe von 2,5 kb auf, von denen eine Bande bei circa 1100 bp sehr distinkt war (Abb. 23A, Pfeil). Diese Bande erschien bei keiner der Einzelprimerkontrollen (Abb. 21, 22) und blieb bei Erhöhung der Anlagerungstemperatur nahezu gleich deutlich, während die anderen Banden in ihrer Dicke abnahmen. Diese spezifische Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und zur Sequenzierung vorbereitet. Wurde ein *cbs3*-Primer verwendet, bei dem ein Codon vertauscht war (*cbs3**, Tab. 7a), so verschwanden die unspezifischen Hintergrundbanden selbst bei niedrigen Anlagerungstemperaturen, während das spezifische Signal bei circa 1100 bp erhalten blieb (Abb. 23B, Pfeil).

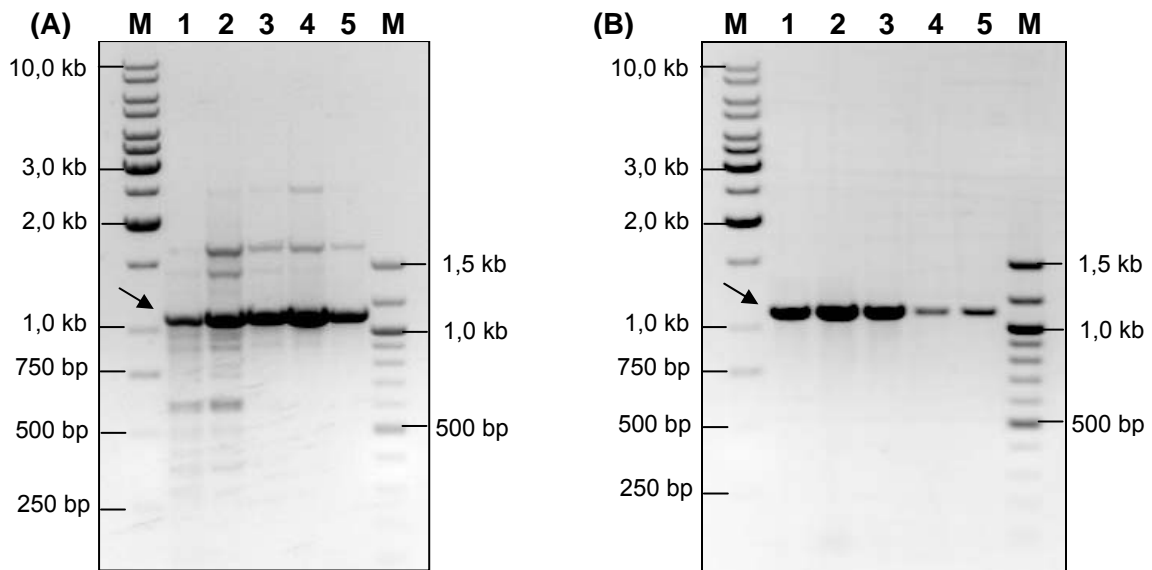


Abb 23: Amplifikation von Laccasegenfragmenten mit Hilfe der Primer *cbs2* und *cbs3* (A) und *cbs2* und *cbs3 (B).** Auf ein 1 %iges Gel wurden pro Spur 5 μ l PCR-Ansatz aufgetragen. M = Marker, 1 kb- bzw. 100 bp-Leiter. 1 = 56 °C, 2 = 58 °C, 3 = 60 °C, 4 = 62 °C, 5 = 64 °C. Der Pfeil markiert die spezifische Bande bei 1100 kb. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Amplifikation der Genfragmente *cbs2/4*

Für die mit den Primern *cbs2* und *cbs4* auf genomischer DNA amplifizierten Laccasegenfragmente wurde eine Größe von zwischen 1100 bp und 1200 bp errechnet. Um die PCR-Bedingungen zu optimieren, wurde eine Gradienten-PCR für die Temperaturen von 54-64 °C durchgeführt. Zudem wurde die MgSO_4 -Konzentration auf 3 mM und auf 6 mM erhöht, um die Spezifität zu verringern. Keine der getesteten Bedingungen lieferte ein Signal.

Amplifikation der Genfragmente *int/cbs3*

Für die mit den Primern 5'-*int* und *cbs3* auf genomischer DNA amplifizierten Laccasegenfragmente wurde eine Größe von zwischen 450 bp und 500 bp errechnet. Bei allen Temperaturen erschien eine spezifische Bande bei circa 500 bp (Abb. 24, Pfeil). Eine weitere Bande mit niedrigerem Molekulargewicht verschwand ab einer Anlagerungstemperatur von 60 °C. Die Bande bei 500 bp wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und zur Sequenzierung vorbereitet.

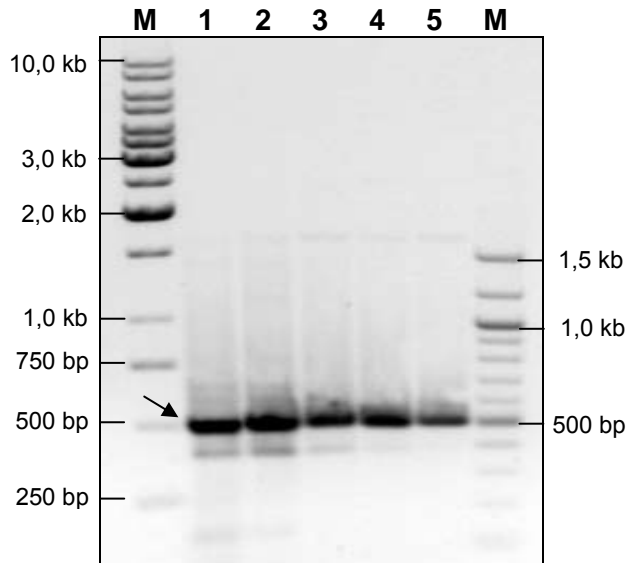


Abb. 24: Amplifikation von Laccasegenfragmenten mit Hilfe der Primer 5'-int und cbs3. Auf ein 1 %iges Gel wurden pro Spur 5 µl PCR-Ansatz aufgetragen. M = Marker, 1 kb- bzw. 100 bp-Leiter. 1 = 56 °C, 2 = 58 °C, 3 = 60 °C, 4 = 62 °C, 5 = 64 °C. Der Pfeil markiert die spezifische Bande. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Amplifikation der Genfragmente int/cbs4

Für die mit den Primern 5'-int und cbs4 auf genomischer DNA amplifizierten Laccasegenfragmente wurde eine Größe von zwischen 650 bp und 700 bp errechnet. Es traten mehrere Banden zwischen 250 bp und 1,5 kb auf, die bei Erhöhung der Anlagerungstemperatur abnahmen, bis nur noch zwei Banden bei circa 900 bp und 1,5 kb sichtbar waren (Abb. 25). Die Elongationszeit wurde von 1 min auf 30 s herabgesetzt, um die Amplifikation größerer Fragmente zu verhindern. Zusätzlich wurde die MgSO_4 -Konzentration von 1,5 mM auf 1 mM herabgesetzt, um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen. Während die Herabsetzung der Elongationstemperatur keinen Einfluss auf das Ergebnis der PCR hatte, verhinderte die Verringerung der MgSO_4 -Konzentration die Amplifikation fast sämtlicher Fragmente. Die Einzelprimerkontrolle zeigte zudem, dass die meisten Amplifikate bereits amplifiziert wurden, wenn nur einer der beiden Primer vorlag. Zwei Fragmente bei 650 bp und bei 900 bp (Pfeile), die im errechneten Größenbereich oder knapp darüber lagen, wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und zur Sequenzierung vorbereitet. Die Fragmente wiesen jedoch keine Ähnlichkeit zu Laccasegenen auf.

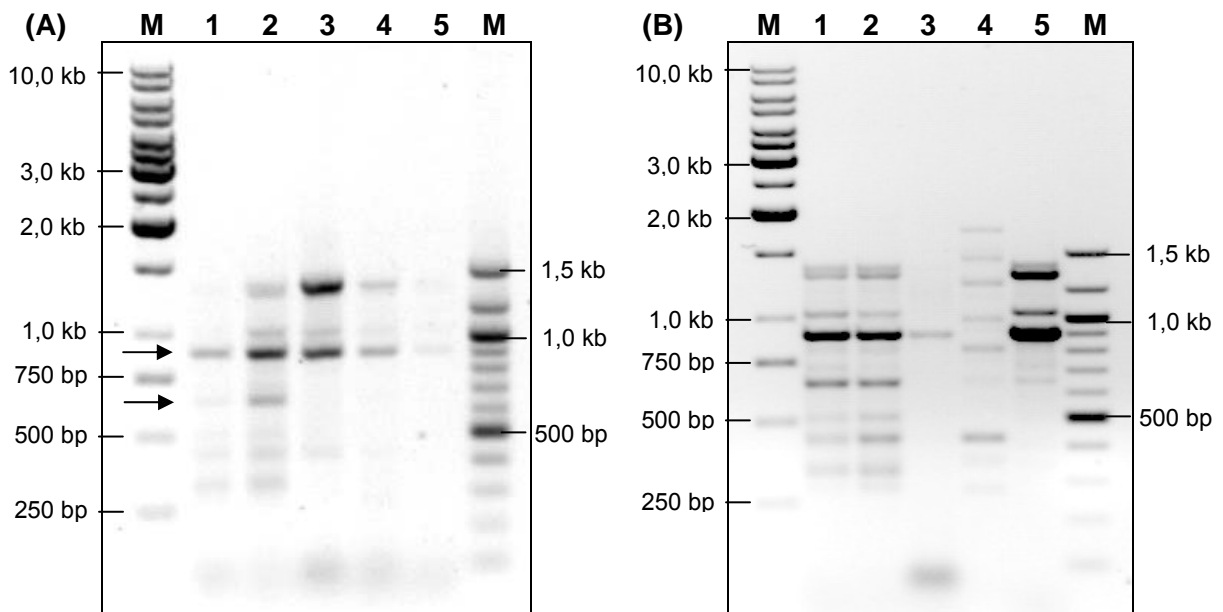


Abb. 25: Amplifikation von Laccasegenfragmenten mit Hilfe der Primer 5'-int und cbs4. Auf ein 1 %iges Gel wurden pro Spur 5 μ l PCR-Ansatz aufgetragen. M = Marker, 1 kb- bzw. 100 bp-Leiter. (A) 1 = 56 °C, 2 = 58 °C, 3 = 60 °C, 4 = 62 °C, 5 = 64 °C, (B) 1-5: 58 °C, 1 = Probe wie A2, 2 = 30 s t_E , 3 = 30 s t_E , 1 mM $MgSO_4$, 4 = EPK 5'-int, 5 = EPK cbs4, 30 s t_E = auf 30 s verkürzte Elongationszeit, EPK = Einzelprimerkontrolle. Die Pfeile markieren die spezifischen Banden bei 650 bp und 900 bp. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Amplifikation von Laccasegenfragmenten mit basidiomycetenspezifischen Primern

Eine weitere Primerkombination wurde von Dipl.-Biol. Harald Kellner, Universität Leipzig, zur Verfügung gestellt. Die Primer cbs1B und cbs2B waren von basidiomycetischen Laccase-sequenzen abgeleitet worden und wurden für diese Arbeit leicht modifiziert. In Abbildung 26 werden die Primer mit den zuvor beschriebenen Primern cbs1 und cbs2 (3.2.2) und mit den Kupferbindestellen von vier ascomycetischen und drei basidiomycetischen Laccasen verglichen. Dabei ist gut zu sehen, dass die größten Übereinstimmungen der Primer cbs1B und cbs2B mit verschiedenen basidiomycetischen Laccasen und mit der Laccase von *Aspergillus nidulans* bestehen. Beide Primer liegen 2-3 Aminosäuren stromaufwärts im Vergleich zu den Primern cbs1 und cbs2, die ausgehend von ascomycetischen Laccasen abgeleitet worden sind.

	cbs1B	cbs2B
primer cbs1H, cbs2H	T T V H W H G	S G T F W Y H S
primer cbs1, cbs2	H W H G ^M H Q K	T S W Y H S H F
<i>A. nidulans</i>	T T V H W H G	A G T F W Y H S
<i>P. anserina</i>	T S I H W H G	Y G T S W Y H S
<i>C. parasitica</i>	T T I H W H G	Y G T S W Y H S
<i>G. graminis</i>	T S I H W H G	Y G T T W Y H S
<i>T. versicolor</i>	T T I H W H G	A G T F W Y H S
<i>P. cinnabarinus</i>	T S I H W H G	A G T F W Y H S
<i>Ph. radiata</i>	T T I H W H G	A G T F W Y H S

Abb. 26: Sequenzvergleich der Primer cbs1B und cbs2B mit den Primern cbs1 und cbs2. Die erst genannten Primer wurden von basidiomycetischen Laccasen (cbs1B) abgeleitet, letztere von ascomycetischen Laccasen. Die Zugangsnummern der Laccasen aus den angegebenen Organismen sind: *A. nidulans* (P17489), *P. anserina* (P78722), *C. parasitica* (AAA09235), *G. graminis* (CAD24841), *T. versicolor* (Q12717), *P. cinnabarinus* (O59896), *Ph. radiata* (Q01679).

Die Primer cbs1B und cbs2B wurden in verschiedenen Kombinationen in einer PCR getestet. Die Kombination cbs1B/2B lieferte bei einer Anlagerungstemperatur von 58 °C ein spezifisches Signal bei circa 160 bp (Abb. 27, Pfeil). Die Kombinationen cbs1B mit cbs2 und cbs1 mit cbs2B lieferten dagegen keine Signale. Die verschiedenen Banden bei Verwendung der Primerkombinationen cbs1B/int, cbs1B/3 und cbs1B/4 konnten auf Grund ihrer Größe als Laccasegenfragmente ausgeschlossen werden. Die erwarteten Größen für cbs1B/int, cbs1B/3 und cbs1B/4 lagen bei circa 750-900 bp, 1200-1400 bp und 1400-1500 bp. Die circa 1300-bp-Bande bei der Primerkombination cbs1B/3 wurde durch Mehrfachbindung des Primers cbs3 verursacht wie aus der EPK zu ersehen ist (Abb. 21). Eine Erhöhung der Anlagerungstemperatur auf 62 °C führte zu einem Verschwinden aller Banden mit Ausnahme der 160-bp-Bande bei cbs1B/2B.

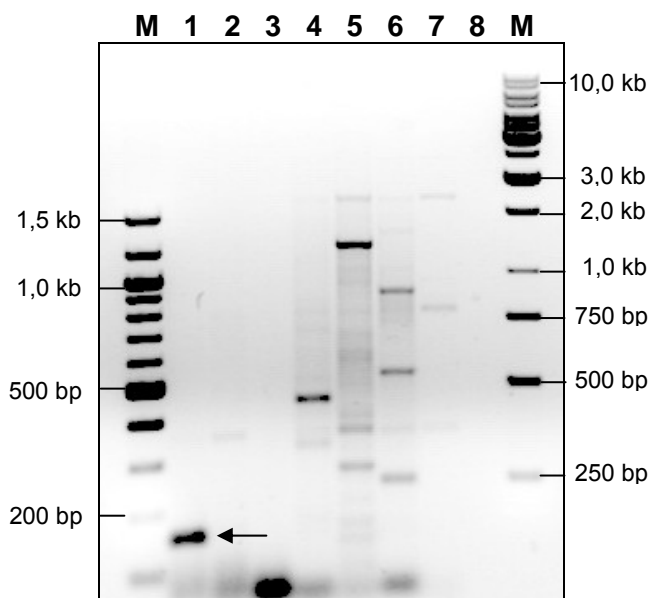


Abb. 27: Amplifikation von Laccasegenfragmenten mit Hilfe des Primers cbs1H in verschiedenen Kombinationen. Auf ein 1 %iges Gel wurden pro Spur 5 µl PCR-Ansatz aufgetragen. Die Anlagerungstemperatur betrug 58 °C. M = Marker, 1 kb- bzw. 100 bp-Leiter. 1 = cbs1B/2B, 2 = cbs1B/2, 3 = cbs1/2B, 4 = cbs1B/int, 5 = cbs1B/3, 6 = cbs1B/4, 7 = EPK cbs1B, 8 = EPK cbs2B, EPK = Einzelprimerkontrolle. Der Pfeil markiert die spezifische Bande. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

3.2.4 Isolierung der amplifizierten Laccasegenfragmente

Nachdem die Bedingungen der PCR für die Amplifikation des jeweiligen Laccasegenfragments optimiert worden waren, wurden die Laccasegenfragmente in einen geeigneten Vektor kloniert, um sie für die DNA-Sequenzierung vorzubereiten. Dafür wurde der gesamte PCR-Ansatz auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Nach der Elution aus dem Gel wurde das PCR-Produkt in das Plasmid pGEM-T Easy kloniert. Dieses Plasmid wurde daraufhin in den *E. coli*-Wirtstamm XL-1 Blue transformiert. Mittels Kolonie-PCR wurden die Klone auf Anwesenheit des gewünschten Fragments überprüft, bevor eine Plasmidisolierung durchgeführt wurde. Das aufgereinigte Plasmid wurde zur Sequenzierung eingeschickt.

3.2.5 Sequenzanalyse der Laccasegenfragmente

Vier der sequenzierten Fragmente wiesen eine hohe Homologie zu bekannten Laccasegenen auf. Es handelt sich um die Fragmente cbs2/int-450, cbs2/3-1100, int/cbs3-500 und cbs1/2-160 (Abb. 19, oben). Zur Vereinfachung werden die Bezeichnungen auch ohne die angehängte Größenangabe der Fragmente verwendet (cbs2/int statt cbs2/int-450). Diese Fragmente wurden computergestützt in die Proteinsequenz übersetzt und mit ascomycetischen Laccasen verglichen. Jeweils ein besonders konservierter Abschnitt wurde ausgewählt und erneut mit den Laccasen verglichen, die die höchsten Homologien zu den Fragmenten zeigten. So konnte der Einfluss der Primersequenzen bei der Berechnung der Identitäten ausgeschlossen werden. Die restlichen sequenzierten Genfragmente zeigten bei Sequenzvergleichen keine nennenswerte Homologie zu Laccasen und wurden deshalb nicht weiter untersucht.

3.2.5.1 Sequenzen der Laccasegenfragmente

Die Sequenzen der Genfragmente cbs2/int-450, cbs2/3-1100, int/cbs3-500 und cbs1/2-160 sind in Abbildung 28 angegeben. Das Fragment cbs2/int umfasst 441 bp, das Fragment cbs2/3 umfasst 1092 bp und das Fragment int/cbs3 umfasst 506 bp. Die Sequenzen von cbs2/int und int/cbs3 sind nicht mit Teilen der Sequenz von cbs2/3 identisch. Die Identitäten liegen bei nur 35 % für cbs2/int und den vorderen Teil von cbs2/3 und bei 39 % für int/cbs3 und den hinteren Teil von cbs2/3. Deshalb musste davon ausgegangen werden, dass die Fragmente zu mindestens zwei verschiedenen Laccasegenen gehören. Diese wurden vorläufig als *lacc1*-Gen (kodiert für eine hypothetische Laccase I und wird repräsentiert durch das cbs2/3-Fragment) und als *lacc2*-Gen (kodiert für eine hypothetische Laccase II und enthält die Fragmente cbs2/int und int/cbs3) bezeichnet. Später stellte sich heraus, dass das int/cbs3-Fragment zu einem dritten Laccasegen *lacc3* gehört, welche

für eine hypothetische Laccase III kodiert. So lange dies unklar war, wurden beide Fragmente als zu *lacc2* gehörig behandelt und trugen auch die gleiche Zugangsnummer in der NCBI-Datenbank. Das Fragment cbs1/2 wurde auf Grund seiner geringen Größe und der mangelnden Überlappung mit den anderen drei Sequenzen keinem der Gene zugeordnet. Erst als in der inversen PCR ein größeres Stück der Sequenz erhalten wurde, konnte das Fragment einem weiteren Gen (*lacc4* kodiert für eine hypothetische Laccase IV) zugeordnet werden (siehe 3.3.3.5).

cbs2/int - 450	ACGTCGTGGTACCACTCGCACTAC*TCCCTCCAGACCTACGAGGGTATGTTCCGGTCCCTC GTCATTGAGGGCCCTCGACCCTTTCCTACGATGAGGAGCAGTTCGTTATCCTCCAGGACT GGAACCACGCCACCGCCGACTCCCTCTTCGATGACTCTCAGGTCGTCTGTTCCCGGCGTTC GCGGCGGTGGGCTCACTCTCGACACTGGTCTGATCAACGGCAAGAAGCTGTGGGGCAAC GGCGGCGAGTACTGGTCCATGACCGTCACCCCGGGCAAGAGCTACCGTCTGCGCGTCCT CAACGCCGCCATCCAGTCCGACGTTCAAGTTCCACATTGACGGCCACTCCTTCCAGGTTATC GCCATGGACTTTGTGCCATCCACCCGTACACCACCGACATTGTCAGCGTCAACATC* <u>GGA CAGCGCTACGACGTCAATC</u>
cbs2/3 - 1100	ACGTCGTGGTACCACTCGCACTAC*TCTGCGCAGTACACTGGTGGCATCTACGGGGCGATG ATCATCCATGGGCGGACTGAGAACGCGCAATACGATGAAGACATTGGCCCCGTCTTTTGA ACGACTGGTATCACGTGTCCTACTACACCACGCTCGAGCAGTAAGTCCGACTCCGTCGTTG CGATTGATTGGTCTCGTCCGTTGCATCATCCATGCTGACTCGAGTCTCAGAGCCATGGCCCCA ATTTCTGCCAAGCTGCCTCCCCCTCAGTCGAATAACAACCTTGATCAACGGCAAGATGAACG TAAGTAGACAGCGAGTCCCTTTGCTTCCGACGACTTGCTTACACTAGACGCAAGTATCCCTG CGCGAACGCTACCGGCCTTCAGTGCACGCCCAACGCCGGCATCTCCAAGTTCACCTTCCA ATCGGGCAAGACCTACCGCCTACGCCTGATCAACGCCGGCGCCGAGGGCATGCAAAAGTT CAGCATTGACGGCCATACCATGACCGTGATTGCGAACGATTTCTGTCGCGTTGAAGCCCTAC CAGACAGACGTCTGTGACGCTCGGCAATTGGACAACGGTCCGACATCATCGTCACCGCGACG GGCAAGGCCGCGCCAGTCTGATGCGCTCGGATCTCGGCCCTCAACGCCCTGTCCAAT CCGGCAGGCTGCACCAACAACGACGGTGTCTCGCCTCTGGCGCTGGCAGCCATCTACTAC GAAGGCGCCGACACCAACTCCGTCCCCACCACCAACTCCACCGTGCCCGAGTCCAGCATC CAGTCGTGCATGAACGACCCGCTCAACATGACCGTACCCTACTACAGCCTCACGCCCTCCA CCACGCCCGCCATGTCGCAAAACATCGACATCACCTTTGCGAGCAACGGCACCAACTACCT CTTCCACATGAACAACCTCCACCTTCCGCGCCGACTACAACGACCCCATCCTGCTCGAAGCG AAGCTCGGGCAGACCGTGTTCCCGGCGGAGGAGAACGTCATCAGCACCGGCAACGCCAG CAGCGTGCGCTTCGTGCTCTACAACCTACGCCTTACCAGGCGCC* <u>CACCCGATCCACCTGCA CGGC</u>
int/cbs3 - 500	GGCCAGCGCTACGACGTGATCATC*ACCGCCGACGCATCCTCCACCTCCTCCTTCTGGATG CGCTCCGAGCTCCTCAATGCCGCAACATGCGGCGGCCTTGCGCCACCCGGAATCAACGAA TTCCCCTATCTTCGCCGAAGTCTACTACGAAGACGCCGACACCACCTCGAGCCCGTGTCCA CCACCACCGTCAAGAGCACCAGCTGCAACAACGCGCCCATCGACATCACGCAACCGGAAT ACGTCATCCCGCCGACGACGACGCCCTTCTACCAAGACCTCGTCTCACCATGACCGTCAA CGATACCGGCTCCTGGGAATGGGAAATCAACGGCCAGACCTACCGCGCAGACTACAACAA CCGCTGCTCTACGACGCCGCGCCGAAACCTCCTTCCCCTCCGACCCGACGTACAA CCTCTACAACCTTCGCTTCCAAACAGCTCGGTCGTCTCAACATCACCAACGCCACCCCTTC CCC* <u>CACCCCATCCACCTGCACGGC</u>
cbs1/2 - 160	ACCACGGTCCACTGGCACGGC*CTGTCAATGCGAGGGGCCAACGAAATGGACGGAGCAGT GGGCATTACCAACGACCCGATACCCGTCAACGGATCCTTCATCTACGATTTTAGAGTGGAA GACGGCCAA* <u>AGCGGGACATTCTGGTACCACAGC</u>

Abb. 28: Sequenzen der Genfragmente cbs2/int-450, cbs2/3-1100, int/cbs3-500 und cbs1/2-160. Das Fragment cbs2/3-1100 (1092 bp) trägt die Zugangsnummer AY351908. Das zugehörige Gen wurde mit *lacc1* bezeichnet. Die Fragmente cbs2/int-450 (441 bp) und int/cbs3-500 (506 bp) trugen zuerst beide die Zulassungsnummer AY351909, da zu dem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich um Fragmente des gleichen Gens handelte. Das zugehörige Gen wurde vorläufig als *lacc2* bezeichnet. Nach Auffinden der vollständigen Gensequenz von *lacc2* wurde das Fragment int/cbs3 dem *lacc3*-Gen zugeordnet (Zugangsnummer DQ060098). Das Fragment cbs1/2 (154 bp) wurde später dem Laccasegen *lacc4* zugeordnet (Zugangsnummer DQ060099). Unterstrichen und durch * abgegrenzt sind die Primersequenzen. (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

3.2.5.2 Homologien der abgeleiteten Laccasefragmente

Alle Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogrammes FASTA mit einer pilzlichen DNA-Bank verglichen. Wenn hauptsächlich Laccasegene als Resultate geliefert wurden, wurde die Sequenz als Laccasegenfragment definiert und mit Hilfe des Computerprogramms BioEdit in die Proteinsequenz übersetzt. Dies erfolgte für die vier unter 3.2.5 genannten Genfragmente. Diese Sequenzen wurden mit der pilzlichen Proteindatenbank SWISS-PROT verglichen, wobei nur noch Homologien zu Laccasen gefunden wurden. Die fünf Laccasen mit den höchsten Homologien zu den vier hypothetischen Laccasefragmenten von *H. acidophila* sind in Abbildung 29 und 30 angegeben, ebenso wie ein Vergleich von Teilbereichen ihrer Sequenzen mit denen der hypothetischen Proteinfragmente von *H. acidophila*.

Die Laccasen mit den höchsten Homologien auf Proteinebene zu den drei Fragmenten cbs2/int, cbs2/3 und int/3 (Abb. 29) gehören zu den ascomycetischen Pilzen *Fusarium proliferatum*, *Botrytis cinerea*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phaeosphaeria spartinicola*, *Stagonophora spec.*, *Buergenerula spartinae*, *Colletotrichum lagenarium*, *Podospora anserina*, *Neurospora crassa*, *Cryphonectria parasitica* und *Phaeosphaeria halima*. Die höchste Homologie zu dem Fragment cbs2/int wurde mit 50,7 % Identität für die Laccase von *Botrytis cinerea* gefunden. Die Auswahl einer konservierten Teilsequenz für einen zweiten Sequenzvergleich führte zu höheren Identitätswerten bei allen fünf Organismen. Das Fragment cbs2/3 wies die größte Ähnlichkeit zu der Laccase von *Fusarium proliferatum* mit einer Identität von 43,9 % auf. Auch hier stiegen die Identitätswerte, wenn nur eine Teilsequenz zum Sequenzvergleich verwendet wurde. Das Fragment int/cbs3 wies insgesamt die niedrigste Homologie zu anderen bekannten Laccasen auf. Diese lag maximal bei 32,2 % Identität für die Laccase von *Podospora anserina*. Die Auswahl einer Teilsequenz führte nur bei zwei Laccasen zu höheren Identitäten.

cbs2/int Teilsequenz 1	Q T Y E G M F G P L	V I E G P S T L S Y
<i>B. cinerea</i>	Q Y G D G L F G P L	V I N G P A T A N Y
<i>G. graminis</i>	Q A W Q G V F G G I	I I N G P A S A N Y
<i>P. spartinicola</i>	Q Y G D G V V G T M	I I D G P A T S N Y
<i>F. proliferatum</i>	Q Y A D G L A G P I	T I F G P S S A H Y
<i>S. spec.</i>	Q Y S D G V W G T M	I I N G P S T K N Y

cbs2/int Teilsequenz 1	D E E Q - F V I L Q	D W N H
<i>B. cinerea</i>	D V D L G M L F L N	D W N H
<i>G. graminis</i>	D E D V G M V V L S	D W G H
<i>P. spartinicola</i>	D E D L G T L P L T	D W Y Y
<i>F. proliferatum</i>	D E A K D P I L I T	D W N H
<i>S. spec.</i>	D I D L G T Y P L T	D W F H

cbs2/int Teilsequenz 2	G K S Y R L R V L N	A A I Q S T F K F H
<i>B. cinerea</i>	G L K Y R I R V V N	T A V D G H F Q F S
<i>G. graminis</i>	G K S Y R F R I V N	T A I D T H F K F G
<i>P. spartinicola</i>	N K K Y R I R I I N	P S V D N Y F S V S
<i>F. proliferatum</i>	G K K Y L L R I I N	T S V D T T F V F G
<i>S. spec.</i>	G K S H S I R L L N	V G I N N W A H V A

cbs2/int Teilsequenz 2	I D G H S F Q V I A	M D F V P I H P Y
<i>B. cinerea</i>	I D G H S F Q V I A	M D F V P I V P Y
<i>G. graminis</i>	I D N H T L T V I A	L D F I P V E P Y
<i>P. spartinicola</i>	M D G H P F T V I T	S D F V P I K P Y
<i>F. proliferatum</i>	I D N H Y F E V M S	S D F V P I H P Y
<i>S. spec.</i>	L D G H K F T V V S	A D F V P I V P Y

	Zugangs-	Identität	Identität	Identität
	nummer		(TS1)	(TS2)
<i>Botrytis cinerea</i>	Q12 570	50,68 %	52,94 %	69,23 %
<i>Phaeosphaeria spartinicola</i>	Q8J 251	45,64 %	40,63 %	50,00 %
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Q8T FD9	45,40 %	44,12 %	58,97 %
<i>Fusarium proliferatum</i>	Q96 UP9	45,33 %	44,12 %	56,41 %
<i>Stagonospora spec.</i>	Q8J 247	44,60 %	41,18 %	48,72 %

Abb. 29A: Sequenzanalyse des hypothetischen Laccase-Fragments cbs2/int.

cbs2/3 Teilsequenz	K T Y R L R L I N A	G A E G M Q K F S I
<i>F. proliferatum</i>	K V H R L R L I N P	S A E A I Q R F S I
<i>N. crassa</i>	K R H R L R L V N T	S A D N T F V V S I
<i>C. parasitica</i>	K R H R L R I I N T	S V E N N F Q V S I
<i>G. graminis</i>	K K H L I R I I N N	S A D A H F Q F S I
<i>P. halima</i>	K K Y R I R I I N T	S V D N Y F S V S L
cbs2/3 Teilsequenz	D G H T M T V I A N	D F V P L K P Y Q T
<i>F. proliferatum</i>	D G H T M K V I A N	D F V P V Q P Y D T
<i>N. crassa</i>	V G H N M T V I E T	D F V P V E P Y A V
<i>C. parasitica</i>	V G H S M T V I E S	D F V P V D S F T T
<i>G. graminis</i>	D G H D L T V V A N	D L V P I K P F K T
<i>P. halima</i>	D G H P F T V I T S	D F V P I K P Y V T

cbs2/3 Teilsequenz	D V V T L G I G Q R	S D I I V T A T G K
<i>F. proliferatum</i>	K V V T L G V G Q R	T D V L V R A N G K
<i>N. crassa</i>	H Q L Y L T V G Q R	Y D V V I K A D Q E
<i>C. parasitica</i>	D S L F V G I G Q R	Y D V T I D A S Q A
<i>G. graminis</i>	K S V R V S I G Q R	Y D V I V E A N A K
<i>P. halima</i>	D Q I T L A I G Q R	Y D V I I S A N Q T
cbs2/3 Teilsequenz	A G Q S Y W M R	
<i>F. proliferatum</i>	L - D S Y W M R	
<i>N. crassa</i>	V - D N Y W I N	
<i>C. parasitica</i>	T - D N Y W M N	
<i>G. graminis</i>	P - G N Y W L R	
<i>P. halima</i>	V - G N Y W F -	

	Zugangs- nummer	Identität	Identität (TS)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Q96 W11	43,92 %	69,12 %
<i>Neurospora crassa</i>	Q87 2X3	32,79 %	43,28 %
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Q03 966	32,88 %	47,76 %
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Q8T FE1	32,29 %	51,47 %
<i>Phaeosphaeria halima</i>	Q8J 250	32,15 %	51,47 %

Abb. 29B: Sequenzanalyse des hypothetischen Laccase-Fragments cbs2/3.

int/cbs3 Teilsequenz	G S - - W E W E I N	G Q T Y R A D Y N N	
<i>F. proliferatum</i>	N V T - - L W T L G	G V A A R T N Y N S	
<i>B. spartinae</i>	G S I T V Y W Q I N	G S A L A V D W E K	
<i>C. lagenarium</i>	G E K I Y R W R V N	G S S M D V Q W D K	
<i>P. anserina</i>	G T P L F V W K V N	G S S I N V D W D K	
<i>B. cinerea</i>	G P I - V T W G I N	L S A I D V D W K K	
int/cbs3 Teilsequenz	P L L Y D A A D G Q	T S F P S D P Q Y N	L Y
<i>F. proliferatum</i>	P T L L L S K L G N	H T F E - - P E W N	V I
<i>B. spartinae</i>	P T L E Y V R T G N	T S Y P - - S D A N	L I
<i>C. lagenarium</i>	P T L Q Y I A E G N	D S W P - - H Q A N	V V
<i>P. anserina</i>	P I V D Y V I A Q N	T S Y P - - P Q A N	V I
<i>B. cinerea</i>	P I L Q Y V L D G N	N S W P - - A S E N	L I

	Zugangs- nummer	Identität	Identität TS
<i>Podospora anserina</i>	P78722	32,22 %	30,0 %
<i>Botrytis cinerea</i>	Q96UM2	32,00 %	32,5 %
<i>Buergenerula spartinae</i>	Q8J239	31,46 %	37,5 %
<i>Fusarium proliferatum</i>	Q96W11	30,64 %	27,5 %
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Q96C497	28,41 %	30,0 %

Abb. 29C: Sequenzanalyse des hypothetischen Laccase-Fragments int/cbs3.

Abb. 29: Sequenzanalyse der hypothetischen Laccase-Fragmente cbs2/int (A), cbs2/3 (B) und int/cbs3 (C) auf Proteinebene. Die sequenzierten Genfragmente wurden in Proteinsequenzen umgeschrieben und mit einer pilzlichen Proteindatenbank verglichen. Die Pilze, deren Laccasen die höchsten Homologien zu den hypothetischen Proteinfragmenten aufwiesen, sind mit der Zugangsnummer ihrer jeweiligen Laccase angegeben. Der am stärksten konservierte Teil innerhalb der jeweiligen Sequenz wurde ausgewählt (TS = Teilsequenzen) und erneut mit den fünf angegebenen Laccasen verglichen. Die Identitätswerte zwischen den Laccasen und den Fragmenten sind ebenfalls angegeben. Dunkelgrau unterlegte Aminosäuren sind identisch, hellgrau unterlegte Aminosäuren sind ähnlich.

Die Sequenz cbs1/2 wies auf Proteinebene die höchste Homologie zu basidiomycetischen Laccasen auf. Wurde die Sequenz mitsamt den Primern für den Sequenzvergleich herangezogen, so lagen die Identitäten zwischen 58 % und 50 %, wurden die Primersequenzen für die Analyse entfernt, so sanken die Identitäten auf zwischen 50 % und 43 %. Die höchste Homologie bestand zu der Laccase von *Trametes versicolor*, einem basidiomycetischen Weißfäulepilz. Es folgten mit *Podospora anserina* und *Aspergillus nidulans* zwei Ascomyceten und mit *Trametes villosa*, *Phlebia radiata* und *Pycnoporus cinnabarinus* erneut drei Basidiomyceten. Wurden die Primer bei der Analyse weggelassen, lag die größte Homologie zur Laccase von *P. anserina* vor. In Abbildung 30 ist die gesamte Sequenz cbs1/2 auf Proteinebene abzüglich der Primer dargestellt.

cbs1/2	L S M R G A N E M D	G A V G I T N D P I
<i>P. anserina</i>	L H Q G T N M H D	G A N G V T E C P I
<i>A. nidulans</i>	L E M E T P E D	G V P G L T Q T P I
<i>T. versicolor</i>	I F Q G T N W D	G A A F V N Q C P I
<i>Ph. radiata</i>	F F Q G T N W A D	G P A F I N Q C P I
<i>P. cinnabarinus</i>	F F Q G T N W A D	G V S F V N Q C P I
cbs1/2	P V N G - S F I Y D	F R V E D G Q
<i>P. anserina</i>	P P K G G S R I Y R	F R A Q - - Q
<i>A. nidulans</i>	E P G A - T F T Y R	F R A Y P - -
<i>T. versicolor</i>	A T G N - S F L Y D	F T V P D - Q
<i>Ph. radiata</i>	A S G D - S F L Y N	F Q V P D - Q
<i>P. cinnabarinus</i>	A S G H - S F L Y D	F Q V P D - Q

	Zugangs- nummer	Identität	Identität TS
<i>Podospora anserina</i>	P78722	57,69 %	50,0 %
<i>Aspergillus nidulans</i>	P17489	52,94 %	45,2 %
<i>Trametes versicolor</i>	Q12717	52,94 %	46,7 %
<i>Phlebia radiata</i>	Q01679	50,98 %	43,3 %
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	O59896	52,94 %	43,3 %

Abb. 30: Sequenzanalyse des Laccase-Fragments cbs1/2 auf Proteinebene. Das sequenzierte Genfragment wurde in die Proteinsequenz umgeschrieben und mit einer pilzlichen Proteindatenbank verglichen. Die fünf Pilze, deren Laccasen die höchsten Homologien zu dem hypothetischen Proteinfragment aufwiesen, sind mit der Zugangsnummer ihrer jeweiligen Laccase angegeben. Die Sequenz abzüglich der Primer wurde erneut mit der Datenbank verglichen angegeben (TS = Teilsequenz). Die Identitätswerte zwischen den Laccasen und den Fragmenten sind ebenfalls angegeben. Dunkelgrau unterlegte Aminosäuren sind identisch, hellgrau unterlegte Aminosäuren sind ähnlich.

3.2.6 Überprüfung der Existenz mehrerer Laccasegene durch „Nested PCR“

Bei Existenz mehrerer Laccasegene in *H. acidophila* sollte jede Primerkombination in der PCR mehrere Amplifikate liefern. Das Auftreten nur einer spezifischen Bande in der Gelelektrophorese für eine bestimmte Primerkombination könnte darauf zurückzuführen sein, dass verschiedene Amplifikate eine ähnliche Größe aufweisen und sich daher im Gel überlagern. Um zu überprüfen, ob das cbs2/3-Fragment, das in der PCR amplifiziert wurde, die Fragmente zumindest zweier Laccasegene (*lacc1* und *lacc2*) enthielt, wurde eine „Nested PCR“ auf diesem cbs2/3-Fragment durchgeführt. Dies wäre eine weitere Bestätigung dafür, dass es sich bei dem Fragment cbs2/int, welches auf Grund der geringen Größe und fehlender konservierter cbs- bzw. int-Region im bekannten Bereich weniger sicher einer Laccase zugeordnet werden konnte als das cbs2/3-Fragment, ebenfalls um ein Laccasegenfragment handelt. Die erwarteten Fragmente hatten eine errechnete Größe von 441 bp (*lacc2*) und 597 bp (*lacc1*). Bei Verwendung der Primerkombination cbs2 und 3'-int wurden zwei Fragmente mit den ungefähren Größen 450 bp und 550 bp amplifiziert (Abb. 31, Pfeile). Beide Fragmente wurden

aus dem Gel eluiert, in den Vektor pGEM-T Easy kloniert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab eine vollständige Übereinstimmung der Sequenzen der 450-bp-Bande der „Nested PCR“ und des Fragments cbs2/int-450. Die Sequenzierung der 550-bp-Bande belegte, dass es sich um das cbs2/int-Fragment des *lacc1*-Gens handelt. Das 550-bp-Fragment wurde digoxigenin-markiert und als Sonde in eine Southern Blot Analyse eingesetzt. Da es sich um den vorderen Teil der cbs2/3-Sonde handelt, sollte das gleiche Bandenmuster nachgewiesen werden wie beim Einsatz der vollständigen cbs2/3-Sonde. Dies war der Fall (Abb. 34) und bestätigte somit die Identität der 550-bp-Bande aus der „Nested PCR“ als Teil von cbs2/3.

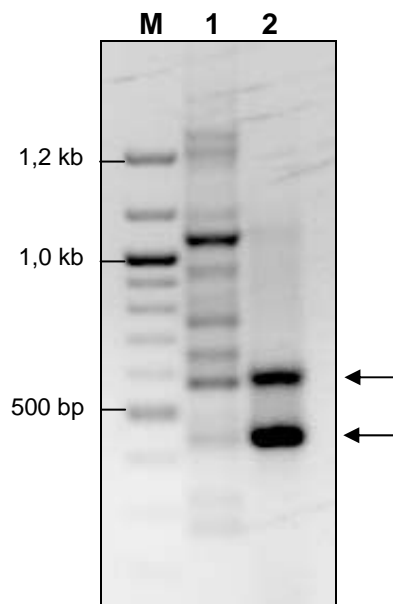


Abb. 31: „Nested PCR“ auf genomischer DNA (1) und auf dem cbs2/3-Fragment (2) mit der Primerkombination cbs2 und 3'-int. Die PCR auf genomischer DNA diente als Kontrolle. Die Anlagerungstemperatur betrug 58°C. Nach der PCR wurden 5 µl der PCR-Ansätze auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die PCR auf genomischer DNA diente zur Kontrolle. Die Pfeile markieren die spezifischen Amplifikate der „Nested PCR“. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Zudem war zu erwarten, dass die Sonde cbs2/int das PCR-Produkt cbs2/3 in der Southern Blot Analyse erkennt, wenn die cbs2/3-Fragmente beider Gene in diesem Amplifikat enthalten sind. Abbildung 32 zeigt, dass dies der Fall war. Die Sonde cbs2/int markierte neben dem 450-bp-Fragment cbs2/int auch das 1100-bp-Fragment cbs2/3 (Pfeile), allerdings deutlich schwächer als die Sonde cbs2/3 dies tat. Die Sonde cbs2/3 markierte nur das cbs2/3-Fragment (Pfeil). Die höhermolekularen Banden sind unspezifische Signale, die häufig auftraten, wenn die Kontrollen überfärbt wurden. Enthält die Sonde cbs2/3 nur das cbs2/3-Fragment des *lacc1*-Gens, so sollte sie nur das cbs2/3-Fragment, nicht aber das cbs2/int-Fragment erkennen. Da die Sonde jedoch mittels PCR hergestellt wurde, sollte sie ebenfalls ein Gemisch aus den cbs2/3-Fragmenten der beiden Gene enthalten. Da Hinweise vorlagen, dass das cbs2/3-Fragment des *lacc2*-Gens in dem Gemisch der Fragmente in deutlich geringerer Konzentration vorlag als das Fragment von *lacc1*, lässt sich auch dieses Ergebnis erklären (siehe Diskussion).

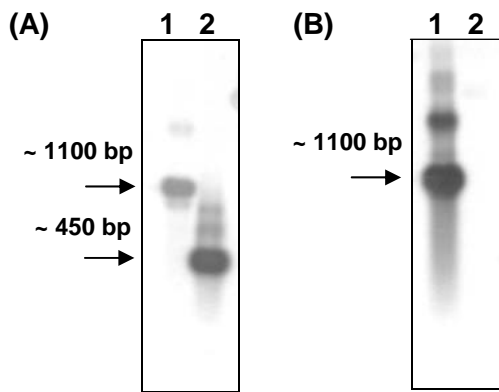


Abb. 32: Southern Blot Analyse zur Kontrolle der „Nested PCR“. Der Nachweis erfolgte mit den Digoxigeninmarkierten Sonden *cbs2/int* (A) und *cbs2/3* (B). Aufgetragen wurden jeweils 2 µl der aus dem Gel eluierten PCR-Produkte *cbs2/3* (1) und *cbs2/int* (2). Die Pfeile markieren die spezifischen Hybridisierungssignale.

Isolation des *cbs2/3*-Fragments des *lacc2*-Gens über „Nested PCR“

In einem nächsten Schritt sollte das *cbs2/3*-Fragment des *lacc2*-Gens sequenziert werden. An Hand dieser Sequenz ließe sich klären, ob es sich bei *cbs2/int* und *int/cbs3* tatsächlich um zwei Fragmente desselben Gens handelt. In diesem Fall ließe sich die Suche nach den vollständigen Sequenzen auf vorerst zwei Gene beschränken. Auf Grund der Ergebnisse der „Nested-PCR“ war bekannt, dass die aus dem Gel eluierte DNA die *cbs2/3*-Fragmente beider Laccasegene enthielt. Beide Fragmente konnten auf Grund des geringen Größenunterschieds nicht im Agarosegel aufgetrennt werden, doch sollten bei Klonierung der eluierten DNA Klone entstehen, die entweder das *cbs2/3*-Fragment des *lacc1*-Gens oder des *lacc2*-Gens enthalten. Diese Klone müssten sich nachweisen lassen, indem eine Kolonie-PCR mit der Primerkombination *cbs2/int* durchgeführt wird, da diese nur den *cbs2/int*-Teil des Laccasegens amplifizieren, der sich in der Größe unterscheidet (Abb. 31).

Cbs2/3-Fragmente, die in der „Nested-PCR“ mit der Primerkombination *cbs2/int* die erwarteten zwei Banden lieferten, wurden in pGem-T Easy kloniert. Die transformierten *E. coli*-Zellen wurden mittels Kolonie-PCR auf Anwesenheit der *cbs2/3*-Fragmente überprüft. Eine zweite Kolonie-PCR mit den Primern *cbs2/int* sollte Aufschluss darüber geben, welches Laccasegen-Fragment in den Zellen enthalten war. Da das Bandenmuster bei dieser Kolonie-PCR sehr unspezifisch war und sich nicht von dem unterschied, welches erhalten wurde, wenn nur der Wirtstamm in die PCR eingesetzt wurde, mussten die Plasmide vor der PCR isoliert werden. Unspezifische Amplifikationen auf dem Vektor pGem-T Easy alleine konnten dagegen ausgeschlossen werden. Die Primerkombination *cbs2/int* amplifizierte auf den *pcbs2/3*-Plasmiden entweder sowohl die 450-bp- als auch die 550-bp-Bande, oder nur die 550-bp-Bande. Da im ersten Fall möglicherweise ein Gemisch aus Plasmiden mit unterschiedlichen *cbs2/3*-Fragmenten vorlag, wurden die Klone neu überimpft und über Nacht ohne Ampicillin angezogen, da bei der Vermehrung ohne Selektionsdruck Plasmide verloren gehen können. So sollte ein Klon erhalten werden, der nur noch eine Art von Plasmiden besitzt. Dies gelang jedoch nicht. Die

Sequenzierung eines *cbs2/3*-Fragments, von dem ausgehend die PCR mit den Primern *cbs2* und 3'-int nur die 450-bp-Bande amplifiziert hatte, lieferte erneut die Sequenz des *cbs2/3*-Fragments des *lacc1*-Gens. Da diese Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt nicht erklärt werden konnten, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt (siehe hierzu 4.2.2).

3.3 Isolierung der vollständigen Laccasegene

Nachdem nachgewiesen worden war, dass mindestens zwei Laccasegene in *H. acidophila* vorliegen müssen, sollte die vollständige DNA-Sequenz dieser Gene ermittelt werden. Eine Sequenzierung der Gene ausgehend von genomischer DNA verspricht wertvolle Einblicke in die Struktur dieser Gene. So können neben der kodierenden Sequenz Promotor- und andere regulatorische Strukturen analysiert werden. Auch die Anzahl und Lage der Introns wäre aus der Sequenz abzulesen. Um die Gene aufzufinden, wurden zwei verschiedene Strategien angewendet. Über die Herstellung einer partiellen genomischen DNA-Bank sollten die Gene gezielt mit Hilfe spezifischer Sonden isoliert werden. Die Herstellung der Genbanken beschränkte sich auf die Gene *lacc1* und *lacc2* repräsentiert durch die Fragmente *cbs2/int* und *cbs2/3*. Mit der inversen PCR konnten dagegen die unbekannten Bereiche, die die bekannten Regionen des Laccasegens flankieren, direkt amplifiziert werden. Die inverse PCR wurden für alle vier bekannten Laccasegenfragmente (*cbs1/2*, *cbs2/int*, *cbs2/3* und *int/cbs3*) durchgeführt.

3.3.1 Auswahl von Restriktionsenzymen und Sonden für die Isolierung der Laccasegene

Es wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt, um geeignete Restriktionsenzyme für die Herstellung der Genbanken auszuwählen und zu überprüfen, ob sich die bekannten Laccasegenfragmente als Gensonden eignen. Gleichzeitig diente die Analyse zur Bestimmung der Größe der erwarteten PCR-Fragmente in der inversen PCR. Die Southern Blot Analyse erfolgte mit über Nacht hydrolysierten genomischer DNA von *H. acidophila*. Zum Nachweis der DNA wurden digoxigeninmarkierte Sonden verwendet, die über digoxigeninspezifische Antikörper detektiert werden können. Der Antikörper wiederum ist an das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, welche die künstlichen Substrate BCIP und NBT unter alkalischen Bedingungen in ein blaues Substrat umwandelt.

3.3.1.1 Synthese der digoxigeninmarkierten Sonden

Die Sonden wurden ausgehend von Plasmid-DNA in einer PCR mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit hergestellt. Zur Sondenherstellung verwendet wurden die Plasmide *pcbs2/int*,

pcbs2/3, pint/cbs3 und pnested-550. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz mit dNTPs ohne Zusatz von digoxigeninmarkierten Nukleotiden angesetzt. Eine Kontrolle des Digoxigenin-einbaus in die DNA erfolgte über Agarosegelelektrophorese. Im Gegensatz zu dem unmarkierten PCR-Produkt läuft das markierte Produkt im Agarosegel langsamer (Abb. 33). Diese Verschiebung kommt durch den Einbau der digoxigeninmarkierten Nukleotide in die Sequenz zustande, die ein höheres Molekulargewicht aufweisen als die unmarkierten. Die Sonden wurden aus dem Agarosegel eluiert und in Hybridisierungslösung verdünnt für die Markierung der DNA eingesetzt.

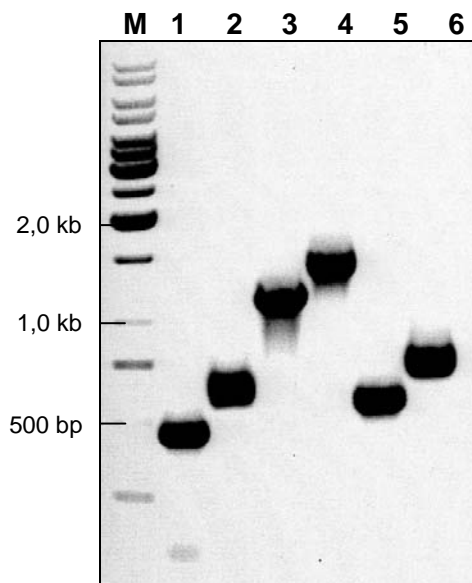


Abb. 33: Überprüfung der digoxigeninmarkierten Sonden in Agarosegel. Zur Herstellung der Sonden wurde auf den Plasmiden pcbs2/int, pcbs2/3 und pint/cbs3 eine PCR mit digoxigeninmarkierten Nukleotiden und als Kontrolle mit unmarkierten Nukleotiden durchgeführt. An Hand des unterschiedlichen Laufverhaltens im Gel lässt sich der Erfolg der Markierung überprüfen. M = Marker, 1,2 = cbs2/int, 3,4 = cbs2/3, 5,6 = int/cbs3, 1,3,5 = Kontrollen, 2/4/6 = Ansätze mit Digoxigenin. Aufgetragen wurden 5 µl der PCR-Ansätze. Die Sonde nested-550 wurde auf die gleiche Weise hergestellt und überprüft, was nicht dargestellt ist (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

3.3.1.2 Southern Blot Analyse

Die Southern Blot Analyse wurde mit genomischer DNA von *H. acidophila* durchgeführt, die über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III oder *Xho*I hydrolysiert worden war. Als Sonde wurden folgende Fragmente verwendet: cbs2/int, cbs2/3, int/cbs3 und das 550-bp-Fragment, welches in der „Nested PCR“ erhalten worden war (Abb. 31). Die ersten drei Sonden dienten dazu, heraus zu finden, ob es sich bei den Fragmenten um Teile von verschiedenen Laccasegenen handelt. Ist dies der Fall, so sollten die Sonden an verschieden große Restriktionsfragmente binden. Die Verwendung der Sonde nested-550 diente dem Beweis der Übereinstimmung dieses Fragmentes mit dem vorderen Abschnitt des cbs2/3-Fragmentes. Zusätzlich lieferte die Southern Blot Analyse Aufschluss darüber, welche Restriktionsenzyme zur Herstellung von Genbanken geeignet sein würden.

Die Sonden cbs2/int, cbs2/3 und nested-550 lieferten eindeutige Ergebnisse. Pro verwendetem Restriktionsenzym wurde genau eine Bande nachgewiesen (Abb. 34, Tab. 15). Die Sonde cbs2/3 band nicht an *Xho*I-hydrolysierte Fragmente. Es zeigte sich, dass cbs2/3 und nested-550 an

Fragmente der gleichen Größe binden, wie nach den Ergebnissen der Sequenzierung zu erwarten war (siehe 3.2.6). Die größere Anzahl an Signalen bei *EcoRI*-Restriktionsfragmenten und Verwendung von nested-550 als Sonde kommt durch unvollständige Restriktionsspaltung zustande. Die Sonde int/cbs3 erzeugte keine spezifischen Signale, obwohl die Stringenz in mehreren Schritten erhöht wurde. So nahm bei Erhöhung der Hybridisierungs- und Waschtemperatur und Erniedrigung der SDS-Konzentration in den Waschpuffern die Stärke des Signals insgesamt ab, ohne dass eine größere Spezifität erreicht wurde. Die SDS-Konzentration in den Waschpuffern wurde auf 0,1x herabgesetzt, die Hybridisierungstemperatur auf 43 °C und die Waschtemperatur auf 70 °C heraufgesetzt. Als Kontrollen wurden die Fragmente cbs2/int, cbs2/3, int/cbs3 und nested-550 unmarkiert direkt aufs Gel aufgetragen. Diese Positivkontrollen reagierten innerhalb weniger Minuten mit dem Farbsubstrat.

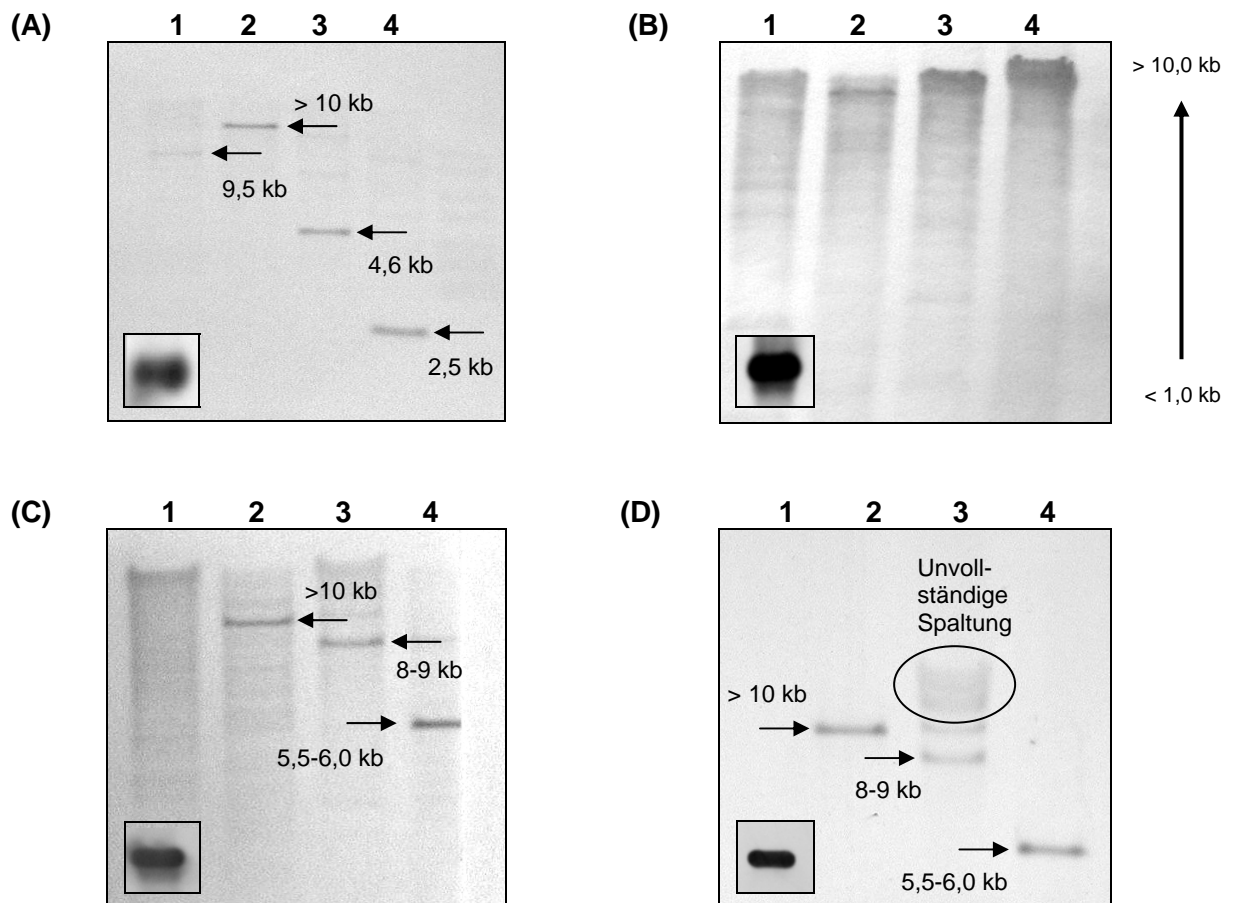


Abb. 34: Southern Blot Analyse genomischer DNA von *H. acidophila* zum Nachweis der Laccase-gene *lacc1* (C und D) und *lacc2* bzw. *lacc3* (A und B). Der Nachweis erfolgte mit den digoxigeninmarkierten Sonden cbs2/int (A), int/cbs3 (B), cbs2/3 (C) und nested-550 (D). Zur Kontrolle wurde das unmarkierte PCR-Produkt der jeweiligen Primerkombination cbs2/int (A und D), cbs2/3 (C) und int/cbs3 (B) aufgetragen (Kasten). Die verwendeten Restriktionsenzyme waren 1 = *XhoI*, 2 = *HindIII*, 3 = *EcoRI* und 4 = *BamHI*.

Tab. 15: Größe der durch die Sonden markierten Fragmente in der Southern Blot Analyse. Genomische DNA wurde mit einem Restriktionsenzym hydrolysiert und anschließend mit einer digoxigeninmarkierten Sonde beprobt. Die Bezeichnung der hydrolysierten und markierten DNA-Fragmente, die weiterverwendet wurden, ist zusätzlich zu der ungefähren Fragmentgröße angegeben. (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Enzym, Sonde	Fragmentgröße	Bezeichnung	Enzym, Sonde	Fragmentgröße
<i>Bam</i> HI, cbs2/int	2,5 kb	B2i	<i>Hind</i> III, cbs2/int	> 10 kb
<i>Bam</i> HI, cbs2/3	5,5 - 6,0 kb	E2i	<i>Hind</i> III, cbs2/3	> 10 kb
<i>Eco</i> RI, cbs2/int	4,6 kb	B23	<i>Xho</i> I, cbs2/int	9,5 kb
<i>Eco</i> RI, cbs2/3	8,0 - 9,0 kb	E23	<i>Xho</i> I, cbs2/3	keine Bande

3.3.2 Isolierung vollständiger Laccasegene über die Herstellung von Genbanken

Ausgehend von den Erkenntnissen der Southern Blot Analyse sollten partielle genomische DNA-Banken für die Isolierung der Gene *lacc1* und *lacc2* hergestellt werden. Dazu wurden die Laccasegen tragenden DNA-Fragmente aus einem Agarosegel eluiert und in den Vektor pBlueScript kloniert. Die dadurch entstehenden Klone konnten entweder mittels PCR oder mittels Koloniehybridisierung auf Anwesenheit der Laccasegene untersucht werden.

3.3.2.1 Herstellung von Laccasegen tragenden Restriktionsfragmenten

Um eine partielle genomische DNA-Bank herzustellen, muss die genomische DNA vor der Klonierung geeignet vorbereitet werden. Auf Grund der Southern Blot Analysen wurden die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI für die Herstellung der Genbanken ausgewählt, da die durch ihre Tätigkeit erzeugten, Laccasegen tragenden DNA-Fragmente einerseits groß genug waren, um ein vollständiges Laccasegen zu enthalten, andererseits nicht zu groß für die Klonierung in einen Plasmidvektor waren. Da die Southern Blot Analyse für die Sonde int/cbs3 kein Ergebnis geliefert hatte, sollten nur partielle Genbanken für die Laccasegene *lacc1* (repräsentiert durch cbs2/3) und *lacc2* (nur repräsentiert durch cbs2/int) hergestellt werden. Insgesamt sollten also vier Genbanken angelegt werden, für jedes Gen jeweils eine Bank mit *Bam*HI und alternativ eine mit *Eco*RI, um so die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass zumindest ein Restriktionsfragment das jeweilige Gen vollständig trägt.

Um die Anzahl der verschiedenen Klone in der Bank möglichst klein zu halten, wurde der Größenbereich der DNA-Fragmente, die einen Teil der Laccasegene trugen, aus einem Agarosegel eluiert. Dieser Größenbereich war wiederum durch die Southern Blot Analyse vorgegeben. Auf diese Art gelang es, für alle vier Ansätze Eluate herzustellen, die die gewünschten Laccasegen tragenden Restriktionsfragmente enthielten. Dies wurde überprüft, indem die Eluate in eine PCR mit den jeweiligen Primerkombinationen cbs2/int und cbs2/3 eingesetzt wurden

(Abb. 35). Bei den Eluaten B2i und E2i wurde ausschließlich ein 450 bp großes Fragment amplifiziert, bei den Eluaten B23 und E23 ein circa 1100 bp großes Fragment.

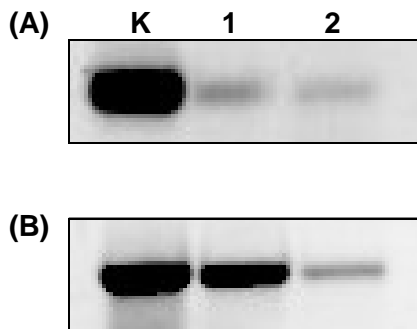


Abb. 35: Überprüfung der Eluate auf Anwesenheit der Laccasegen tragenden DNA-Fragmente mittels PCR. Die *lacc2*-haltigen Eluate B2i und E2i (A) wurden mit der Primerkombination cbs2/int überprüft, die *lacc1* tragenden Eluate B23 und E23 (B) mit der Primerkombination cbs2/3. Pro Ansatz wurde 2 µl Eluat in die PCR eingesetzt. Auf das 1 %ige Agarosegel wurden 5-10 µl der PCR-Ansätze aufgetragen. Als Kontrolle wurde die jeweilige PCR auf den Plasmiden pcbs2/int und pcbs2/3 ausgeführt. K = Kontrolle, 1 = *Bam*HI-gespaltene Eluate, 2 = *Eco*RI-gespaltene Eluate. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

3.3.2.2 Herstellung der DNA-Banken

Die überprüften Eluate wurden in den Vektor pBlueScript SK (+) kloniert. Anschließend erfolgte die Transformation der Plasmide in die *E. coli*-Stämme XL1-Blue und XL1-Blue MRF'. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Blau-Weiß-Selektion überprüft. Es wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet, um kompetente *E. coli*-Zellen für die Transformation herzustellen. Obwohl beide Methoden kompetente Zellen mit nahezu den gleichen Transformationseffizienzen von durchschnittlich $4 \cdot 10^7$ (für die Methode nach Inoue *et al.*) und $5,5 \cdot 10^7$ (für die vereinfachte Methode) erzeugten, erwies sich die vereinfachte Methode als nicht geeignet für die Transformation von laccasehaltigen Ligationsansätzen. So wurden pro Transformationsansatz nur sehr wenige Kolonien erhalten und diese bildeten immer einen großen Hof von Satellitenkolonien, was bei Verwendung der Methode nach Inoue nicht der Fall war. Die quantitative Auswertung dieser Transformationsansätze war deshalb meist nicht möglich. Zudem verloren die kompetenten Zellen bei Lagerung bei -80°C innerhalb von vier Monaten deutlich an Effizienz, was eine Kontrolltransformation mit pUC18 zeigte. Aus diesen Gründen wurden zur Transformation nur Zellen verwendet, die nach der Methode von Inoue *et al.* kompetent gemacht worden waren.

Es zeigte sich, dass die verschiedenen Ligationsansätze, die zur Herstellung der Genbanken verwendet wurden, unterschiedliche Transformationsraten aufwiesen (Tab. 16), wobei keine direkte Abhängigkeit von der Größe der Plasmide sichtbar wurde. Stattdessen schienen die mit *Bam*HI hydrolysierten Fragmente in pBlueScript besser transformierbar zu sein als die mit *Eco*RI hydrolysierten, wie am höheren Anteil weißer Kolonien zu erkennen ist. Unterschiede zwischen den zwei *E. coli*-Stämmen konnten nicht festgestellt werden.

Tabelle 16: Vergleich der Transformationsraten der vier zur Herstellung von Genbanken verwendeten Ligationsansätzen. Angegeben ist der Prozentsatz weißer Kolonien als Maß für erfolgreiche Transformation mit Insert tragenden Plasmiden, wo möglich mit dazugehöriger Standardabweichung. Dabei werden zwei verschiedene *E. coli*-Stämme und zwei Methoden zum Kompetentmachen dieser Zellen verglichen. n. a. = nicht auswertbar (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Methode	Stamm	Weiße Kolonien (in %)			
		pB2i	pE2i	pB23	pE23
Inoue <i>et al.</i>	XL1-Blue	54,5 +/- 9,6	31,2 +/- 5,8	65,4 +/- 13,9	31,4 +/- 6,1
	MRF'	57,8 +/- 5,8	32,1 +/- 4,8	61,8 +/- 8,8	26,3 +/- 3,7
vereinfacht	XL1-Blue	n. a.	26,7 +/- 7,2	57,3 +/- 9,1	57,4 +/- 5,4
	MRF'	n. a.	49,3 +/- 16,8	85,1 +/- 9,1	42,3 +/- 14,6

3.3.2.3 Durchmusterung der Genbanken

Nach Herstellung der partiellen genomischen DNA-Banken mussten diese Banken daraufhin untersucht werden, ob die Laccasegene enthalten waren. Die einfachste Möglichkeit für dieses Screening besteht darin, transformierte und unter Selektionsdruck angezogene Klone einer Kolonie-PCR mit den cbs-Primern zu unterziehen. Diese Methode eignet sich jedoch nur, wenn keine zu hohe Anzahl an Klonen untersucht werden muss, da sie sehr aufwändig ist. Ist die zu erwartene Anzahl an positiven Klonen gering, empfiehlt es sich, den Nachweis über eine so genannte Koloniehybridisierung zu führen. Hierzu wurden die Kolonien auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit den Sonden cbs2/int und cbs2/3 hybridisiert. Zum Durchsuchen der Genbanken wurden beide Methoden verwendet.

Durchmusterung mittels Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurden immer 5-10 Klone vereinigt, um eine größere Zahl Klone untersuchen zu können. Bei einem positiven Ergebnis konnten die vereinigten Klone erneut einzeln in die PCR eingesetzt werden. Problematisch bei dieser Methode war, dass die verwendeten Primerkombinationen cbs2/int und cbs2/3 in der Kolonie-PCR mehrere unspezifische Banden auch im Größenbereich der spezifischen Banden erzeugten, die durch Anlagerung der Primer an *E. coli*-DNA entstanden, wenn keine spezifische Matrize vorhanden war. Dies konnte durch Kontrollen mit dem plasmidlosen Stamm XL1-Blue als PCR-Matrize aufgezeigt werden. Deshalb war ein Nachweis der Laccasegenfragmente mittels Kolonie-PCR nicht möglich. Da die Isolierung der einzelnen Plasmide, ihre Restriktionsspaltung und die anschließende PCR wesentlich aufwändiger waren, sollte dies nur mit Klonen geschehen, die im spezifischeren Plaque Assay als positiv erkannt wurden.

Durchmusterung mittels Koloniehybridisierung (Plaque Assay)

Die Koloniehybridisierung lieferte für alle Transformationsansätze eine sehr hohe Quote an positiven Klonen. Insgesamt wurden mehrere hundert Klone untersucht, wobei ausgeschlossen wurde, dass die Sonden mit dem Stamm oder dem Plasmid alleine oder auch untereinander kreuzreagierten (Abb. 36). Während die Sonde cbs2/3 in der Kontrolle nur den pcbs2/3 tragenden Klon markierte, hybridisierte die Sonde cbs2/int auch mit dem pBlueScript SK (+) tragenden und dem pcbs2/3 tragenden Stamm. Die Signale waren hier jedoch sehr schwach im Vergleich zum spezifischen Signal. Eine Erhöhung der Stringenz während der Inkubation führte zu keiner weiteren Verringerung dieser schwachen unspezifischen Signale. Nach dem Ergebnis der Southern Blot Analyse, bei der die Sonde cbs2/int ebenfalls das PCR-Produkt cbs2/3 markiert hat, war diese unspezifische Reaktion der Sonde cbs2/int zu erwarten.

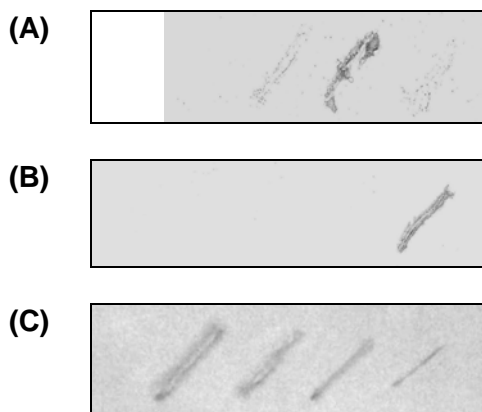


Abb. 36: Überprüfung der Sondenpezifität im Plaque Assay. Überimpft wurden die Stämme *E. coli* XL-1 Blue, *E. coli* XL-1 Blue pBlueScript SK (+), *E. coli* pcbs2/int und *E. coli* pcbs2/3 (von links nach rechts). Der Nachweis erfolgte über die Sonden cbs2/int (A) und cbs2/3 (B). In (C) ist das Wachstum der Klone auf LB-Festmedium gezeigt. Die Filter wurden nach der Sondenhybridisierung mit 2x SSC; 0,1 % SDS und 0,5x SSC; 0,1 % SDS gewaschen. Der Nachweis erfolgte über digoxigenin-markierte Antikörper.

Auf Grund dieser Kreuzreaktion der cbs2/int-Sonde wurden die entsprechenden Primer ebenfalls auf Kreuzreaktion in der PCR getestet. Die Primer cbs2/int lieferten ähnlich wie in der „Nested PCR“ immer 1-2 Signale auf dem Plasmid pcbs2/3 (Pfeile), während die Primer cbs2/3 auf pcbs2/int kein Fragment amplifizierten (Abb. 37). Da die Primerkombination cbs2/int in einer PCR mit dem Vektor pBlueScript SK (+) als Matrize unspezifische Signale amplifizierte, von denen eines im Agarosegel auf der gleichen Höhe lief wie die spezifische 450-bp-Bande, sollte generell die Spezifität der Primer cbs2/int durch Verwendung verschiedener Matrizen überprüft werden. Abbildung 37 zeigt exemplarisch, dass die Primerkombination cbs2/int auf pcbs2/int ein deutliches Signal bei 450 bp lieferte, bei der Verwendung des Plasmids cbs1/3 als alternative Matrize zwar mehrere Fragmente amplifiziert wurden, darunter jedoch nicht die 450-bp-Bande. Dies verdeutlicht, dass die 450-bp-Bande abhängig von der DNA-Matrize und somit spezifisch für das *lacc2*-Gen war.

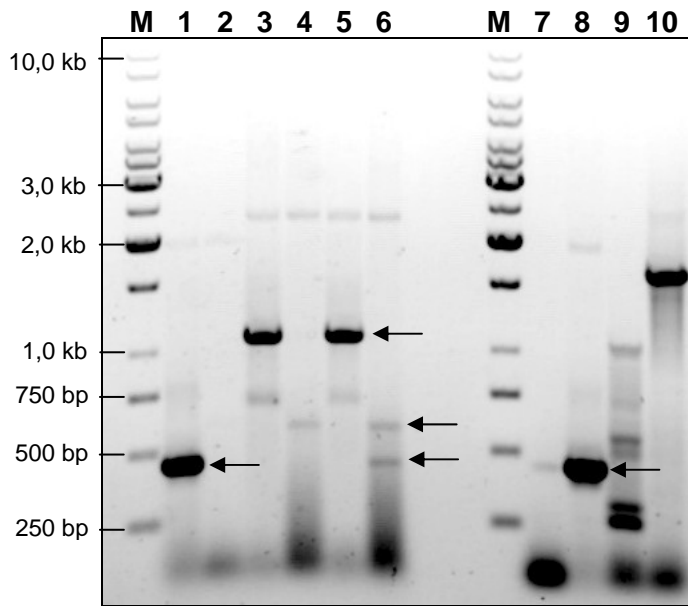


Abb. 37: Gelelektrophorese von PCR-Produkten zur Überprüfung der Spezifität der Primerkombination cbs2/int. Die verwendete Primeranlagerungstemperatur betrug 58 °C für die Kombination cbs2/int (1, 4, 6, 7, 8 und 9), 62 °C für die Kombinationen cbs2/3 (3, 5) und 60 °C für die Kombination cbs1/3 (10). Als Matrize eingesetzt wurden pcbs2/int (1, 2 und 8), pcbs2/3 (3-6) und pcbs1/3 (9 und 10). Eine Wasserkontrolle wurde ebenfalls durchgeführt (7), um Kontaminationen der Reagenzien auszuschließen. Je 5 µl der Reaktionsansätze wurden auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Pfeile markieren spezifische Signale (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Weitere Untersuchung von positiven Klonen

Einige der in der Koloniehybridisierung positiven Klone wurden überimpft, um Plasmide zu isolieren. Diese wurden restriktionsgespalten und das Insert in die PCR eingesetzt. Abbildung 38 zeigt die Analyse zweier Plasmide, die mit der Sonde cbs2/int hybridisierten. Der eine Klon enthielt ein 2,5-kb-Fragment, welches mit *Bam*HI, der zweite Klon enthielt ein circa 5 kb großes Fragment, welches mit *Eco*RI aus dem Vektor herausgeschnitten werden konnte. In der PCR wurden ausgehend von den Inserts zwei Fragmente bei 450 bp (unterer Pfeil) und 550 bp amplifiziert, wenn die Primerkombination cbs2/int verwendet wurde. Nachdem die Sequenzierung des 450-bp-Fragments bestätigt hatte, dass es sich um das Fragment cbs2/int handelte, wurde das Insert des Plasmids pB2i vollständig sequenziert. Das Fragment wies jedoch keine Ähnlichkeit mit einem Laccasegen auf. Zudem enthielt es nicht die Sequenz der Sonde cbs2/int.

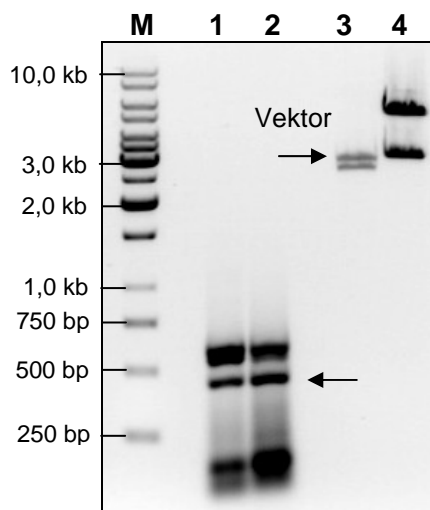


Abb. 38: Untersuchung der im Plaque Assay positiv getesteten Klone. Die Plasmide pB2i und pE2i wurden isoliert und mit *Bam*HI bzw. *Eco*RI hydrolysiert. Die Inserts wurden als Matrize in die PCR mit der Primerkombination cbs2/int eingesetzt. M = Marker, 1/3 = pB2i, 2/4 = pE2i, 1/2 = PCR-Ansätze, 3/4 = Restriktionsansätze (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Für die Restriktionsfragmente B23 und E23 wurden keine Plasmide erhalten, in denen sich über PCR das cbs2/3-Fragment nachweisen ließ (nicht gezeigt). Aus den Plasmiden der Klone, die im Plaque Assay positiv reagiert hatten, wurden durch Restriktionsspaltung viele kleine Fragmente herausgeschnitten. Da die Plasmide mit dem Restriktionsenzym hydrolysiert wurden, mit dem auch die genomische DNA zur Herstellung der Inserts gespalten worden war, ließen sich diese Fragmente nicht durch Schnittstellen in den klonierten Fragmenten erklären. Die Möglichkeit unspezifischer Hydrolyse durch eine so genannte „Star“-Aktivität der Restriktion wurde durch Herabsetzen der Enzymkonzentration und Reduktion der Inkubationszeit ausgeschlossen. Zudem wurden die Inserts statt in den Vektor pBlueScript SK (+) zusätzlich in das Plasmid pUC18 überführt. So sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass die Sonden in der Koloniehybridisierung trotz der durchgeführten Kontrollen unspezifisch mit dem Vektorrückgrat interagieren. Zusätzlich konnte so überprüft werden, ob die kleinen Fragmente möglicherweise durch unspezifische Hydrolyse des Vektors zustande kamen, da in diesem Fall bei Verwendung eines anderen Vektors ein anderes Restriktionsmuster entstehen sollte. Bei Transformation mit den pUC18-Derivaten (pUC-B23, pUC-E23) zeigte sich in der Koloniehybridisierung ein ähnliches Verhältnis von positiven zu negativen Klonen. Die untersuchte Plasmide lieferten jedoch keine in der PCR positiven Klone. Zur Sicherheit wurden verschiedene Plasmide, die im Plaque Assay positiv, in der PCR jedoch negativ waren, in einer Southern Blot Analyse mit Hilfe der Sonden cbs2/int und cbs2/3 untersucht. Es zeigte sich, dass die Sonden kein Plasmid spezifisch markierten.

Kolonie-Screening mittels ABTS-Platten

Da das Screening der Kolonien mit Hilfe der Koloniehybridisierung recht aufwändig ist, sollte untersucht werden, ob sich ABTS-Platten zum Auffinden Laccasegen tragender Klone eignen. Diese Platten werden normalerweise dazu verwendet, um zu prüfen, ob Pilze eine extrazelluläre Laccase produzieren, da dieses Enzym das in den Platten enthaltene ABTS oxidiert, was an der grünen Färbung zu erkennen ist. Wenn *E. coli*-Zellen, die auf einem Plasmid ein Laccasegen tragen, auf den Platten angezogen werden und dieses Enzym sezernieren, sollte dies an Hand der grünen Färbung sichtbar werden.

Folgende Voraussetzungen müssen erfüllt sein, damit der Test anwendbar ist:

- 1) Das in den Plasmiden enthaltene Laccasegen muss vollständig sein oder zumindest so vollständig, dass das resultierende Enzym funktionsfähig ist.

- 2) Das Gen darf keine Introns enthalten oder zumindest keine, die den Leserahmen ändern, da Introns in Bakterien nicht aus der mRNA entfernt werden.
- 3) Das Gen muss abgelesen werden, damit ein Protein entstehen kann. Dies bedeutet, dass ein Plasmid mit einem starken Promotor, also ein Expressionsvektor, verwendet werden muss.
- 4) Für die Enzymaktivität darf keine fehlerfreie Glykosylierung notwendig sein, da diese in Bakterien nicht durchgeführt werden kann.
- 5) Das Bakterium *E. coli* muss in der Lage sein, bei einem pH-Wert auf den Platten zu wachsen, bei dem die ABTS-Oxidation stattfinden kann.
- 6) Die ABTS-Oxidation muss in ABTS-Platten mit Trypton deutlich sichtbar sein, oder aber *E. coli* muss auf synthetischem Medium wachsen können.
- 7) *E. coli* darf selbst keine Laccase oder andere extrazelluläre Oxidase synthetisieren, die im ABTS-Plattentest detektiert werden würde.

Zu Beginn wurde überprüft, ob das Wachstum der Zellen und die ABTS-Oxidierbarkeit miteinander in Einklang zu bringen sind, da dies eine Grundvoraussetzung für die Durchführbarkeit des ABTS-Tests ist. Dazu wurde *H. acidophila* auf ABTS-Platten mit und ohne Trypton und mit den pH-Werten 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 und 7,5 angeimpft (Abb. 39). Auf allen Platten erfolgte ein deutlich sichtbares Wachstum. ABTS-Oxidation trat jedoch nur bei den pH-Werten 5,0 und 5,5 auf, wobei bei pH 6,0 nach zweiwöchiger Inkubation ebenfalls eine schwache Oxidation sichtbar wurde. Die Oxidation war auf Platten ohne Trypton an Hand der Grünfärbung deutlich zu erkennen. Auf tryptonhaltigen Platten dagegen führte die ABTS-Oxidation zu einer violetten Färbung, die sich nur schwer von der bräunlichen Eigenfärbung der Platte unterscheiden ließ.

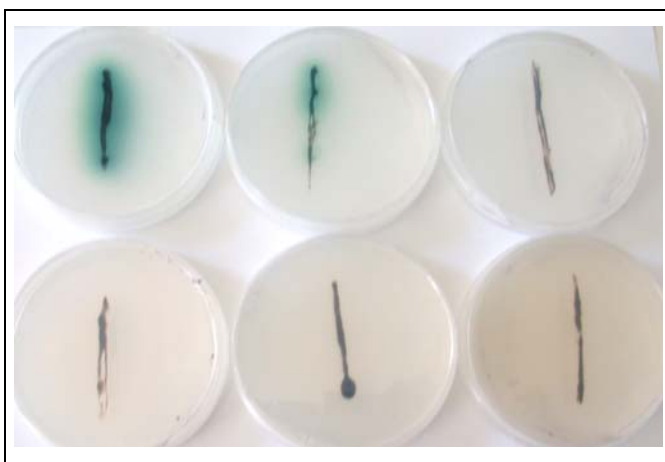


Abb. 39: ABTS-Test auf Festmedium mit unterschiedlichen pH-Werten. Der pH-Wert der Platten betrug (von links nach recht, erst obere dann untere Reihe): 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5. Auf den Platten wurde *H. acidophila* strichförmig angeimpft. Die Platten wurden nach 7 Tagen Inkubation bei 25 °C fotografiert.

Zusätzlich konnte durch die Anzucht von *E. coli* auf ABTS-haltigem Festmedium überprüft werden, ob das Bakterium eine extrazelluläre Oxidase produziert. *E. coli* wurde auf den

gleichen Platten angeimpft wie *H. acidophila*. Auf ABTS-Platten mit Trypton erfolgte ausreichend schnelles Anwachsen nur bei den pH-Werten 7,0 und 7,5. Nach 2 Tagen traten bräunlich-violette Kolonien auf (nicht gezeigt). Nach 5 Tagen waren auch die ATBS-Platten mit einem pH-Wert von 6,5 bewachsen. Bei den Platten mit niedrigerem pH-Wert zeigte sich erst nach circa 2 Wochen ein leichtes Wachstum. Wurden dagegen ABTS-Platten mit Minimalmedium verwendet, kam es bei keinem pH-Wert zu einem ausreichenden Wachstum der Bakterien. Da damit die Grundvoraussetzung für das Screening nicht erfüllt war, wurde der Versuch nicht weitergeführt.

3.3.3 Isolierung vollständigen Laccasegene über inverse PCR

Da die Isolierung der vollständigen Laccasegene über die Herstellung von Genbanken nicht erfolgreich war, wurden die Gensequenzen über inverse PCR ermittelt. Wichtig für ein Gelingen der inversen PCR ist die Auswahl der Restriktionsenzyme und die Konstruktion der Primer. Ausgehend von den bekannten DNA-Abschnitten cbs2/int, cbs2/3, cbs1/2 und int/cbs3 konnten Primer so abgeleitet werden, dass eine PCR nur möglich war, wenn die DNA-Fragmente zu einer ringförmigen Struktur ligiert wurden. Es wurden verschiedene Varianten der inversen PCR durchgeführt, die jeweils im Zusammenhang mit dem Gen vorgestellt werden, für dessen Isolierung sie verwendet wurden. Grundlegende Versuche zur Etablierung der Methode wurden an Hand der Gene *lacc1* und *lacc2* durchgeführt.

3.3.3.1 Etablierung der Methode

Um die Methode zu etablieren, wurde nach jedem Schritt eine Kontroll-PCR mit den Primern cbs2/int und cbs2/3 durchgeführt, deren Bindestellen weiterhin vorhanden waren. So lange die selbstligierten Fragmente nicht linearisiert waren, konnten diese Primer daher als Kontrollprimer verwendet werden. Dadurch ließ sich verfolgen, ob nach den verschiedenen Fällungsschritten noch ausreichend DNA in den Proben enthalten war. Zudem konnte der Erfolg der zweiten Restriktionsspaltung zur Linearisierung überprüft werden, da in diesem Fall die Kontroll-PCR negativ ausfallen musste. Mit Hilfe dieser Kontrolle konnte gezeigt werden, dass die Fällungen nicht mit einem Verlust von DNA einhergingen. Dies konnte folglich als Fehlerquelle ausgeschlossen werden, wenn die inversen Primer in der PCR kein Signal lieferten. In Abbildung 40 ist zu sehen, dass das cbs2/3-Fragment (oberer Pfeil) nach der zweiten Restriktionsspaltung nicht mehr amplifiziert wurde, was darauf hinwies, dass diese Hydrolyse mit *Apa*LI erfolgreich verlaufen war. Die Spaltung mit *Cfr*9I war dagegen nicht vollständig, da das cbs2/int-Fragment (unterer Pfeil) auch nachher noch amplifiziert wurde. Dennoch war zu beobachten, dass die

unspezifischen Signale in der PCR nach dieser Restriktionsspaltung zunahmen, was darauf schließen ließ, dass zumindest ein Teil der Fragmente linearisiert wurde und so spezifische Primerbindestellen verloren gingen.

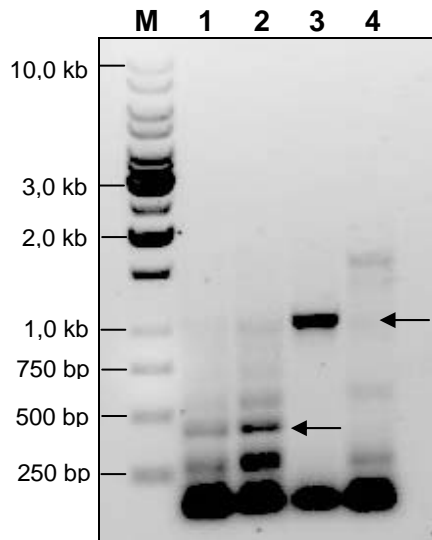


Abb. 40: Kontrolle der zweiten Restriktionsspaltung zur Linearisierung des selbstligierten DNA-Fragmente. Nach der Selbstligation wurden die Fragmente mit den Enzymen *Cfr9I* (2) bzw. *ApaLI* (4) linearisiert. Mit linearisierten Fragmenten (2 und 4) und nicht-linearisierten Fragmenten (1 und 3) wurde eine PCR mit den Primerkombinationen *cbs2/int* (1 und 2) und *cbs2/3* (3 und 4) durchgeführt. Von den PCR-Ansätzen wurden 5 µl auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Zur Erzeugung der Restriktionsfragmente war *BamHI* verwendet worden, doch lieferte die Verwendung von *EcoRI* das gleiche Ergebnis. Die nicht-linearisierten Fragmente wurden vor der PCR gefällt, sodass diese gleichzeitig als Kontrolle der Fällung diente. Die Pfeile markieren die spezifischen Amplifikate (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Zudem wurde genomische DNA von *H. acidophila* mit allen für die inverse PCR in Frage kommenden Restriktionsenzymen hydrolysiert, um zu überprüfen, ob die Hydrolyse vollständig erfolgte. Ist dies nicht der Fall, so ist davon auszugehen, dass die von den Enzymen generierten DNA-Fragmente zu groß sind, um in der inversen PCR amplifiziert zu werden. In Abbildung 41A ist hydrolysierte DNA dargestellt, die mit Enzymen geschnitten wurde, welche überlappende Enden erzeugen. Während *AviII*, *BamHI*, *HindIII* und *XhoI* die DNA gut hydrolysierten, schnitten *EcoRI*, *PstI* und *SphI* kaum. Die Enzyme *EcoRI* und *PstI* wurden trotzdem für die inverse PCR verwendet; *EcoRI*, weil durch den Southern Blot die Größe der erwarteten Fragmente bekannt war, *PstI*, weil das Enzym nach der *in silico* Restriktionsanalyse der bekannten Sequenzen günstige Schnittstellen aufwies. In Abbildung 41B ist hydrolysierte DNA gezeigt, die mit Enzymen geschnitten wurde, welche glatte Enden erzeugen. Von diesen Enzymen schnitten *Bsp68I*, *MstI*, *PvuII*, *SmaI* und *StuI* sehr gut, während *DraI*, *EcoRV*, *PdiI* und *Ecl136II* kaum schnitten. Zur Verwendung für die inverse PCR ausgewählt wurden die Enzyme *Bsp68I*, *PvuII*, *SmaI* und *StuI*.

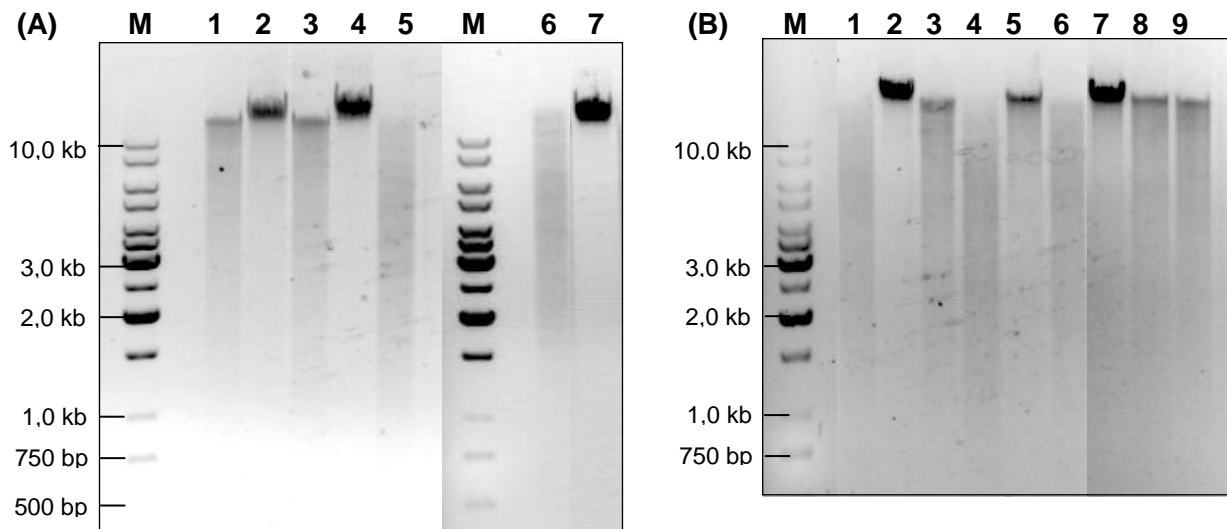


Abb. 41: Gelelektrophorese von hydrolysiertem genomischer DNA von *H. acidophila*. Pro Restriktionsansatz wurde 1 µg genomischer DNA mit 10 U Enzym über Nacht bei 37 °C gespalten. Die Ansätze wurden vollständig auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. **(A)** Alle Enzyme erzeugen überlappende Enden. 1 = *Bam*HI, 2 = *Eco*RI, 3 = *Hind*III, 4 = *Sph*I, 5 = *Xho*I, 6 = *Avi*II, 7 = *Pst*I. **(B)** Alle Enzyme erzeugen glatte Enden. 1 = *Bsp*68I, 2 = *Dra*I, 3 = *Eco*RV, 4 = *Mst*I, 5 = *Pdi*I, 6 = *Pvu*II, 7 = *Ecl*136II, 8 = *Sma*I, 9 = *Stu*I. (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

3.3.3.2 Inverse PCR zur Isolierung von *lacc1* (*cbs2/3*)

Um die Sequenz von *lacc1* zu erhalten, wurden Primer ausgehend von *cbs2/3* abgeleitet. In Abbildung 42 sind die verwendeten Primerbindestellen und Restriktionsenzyme schematisch dargestellt. Zum Verständnis der Methode muss zwischen zwei Ansätzen unterschieden werden. In einem Ansatz wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass sie nicht in der bekannten Sequenz schneiden. So erhält man nach der Selbstligation sowohl die unbekannten Fragmente, die am 5'-Ende als auch die, die am 3'-Ende des bekannten Fragments anschließen (Abb. 42A). Eine weitere Möglichkeit ist, das Restriktionsenzym so zu wählen, dass in der bekannten Sequenz geschnitten wird, und anschließend durch Wahl der Primerbindestellen den Bereich des DNA-Abschnitts vorzugeben, der amplifiziert werden kann. Abbildungen 42B und E zeigen dies für das 5'-anschließende Fragment und Abbildungen 42C und D für das 3'-anschließende Fragment. Wichtig ist, dass das Restriktionsenzym nur auf einer Seite von den abgeleiteten Primern schneidet, da sonst keine Amplifikation stattfinden kann. Die Primer wurden entweder ausgehend von der bekannten Sequenz abgeleitet (*inv23*, *invP*, *invlacc1*) oder es wurden die bereits vorher verwendeten *cbs*- bzw. *int*-Primer eingesetzt (3'-*cbs2*, *int*, 5'-*cbs3*). Die selbstligierten Fragmente konnten mit einem weiteren Restriktionsenzym (*Avi*II, *Apa*LI) linearisiert werden, um die PCR zu vereinfachen. Da im ersten Ansatz das 5'-Ende des Gens *lacc1* nicht erhalten wurde, wurden von dem zu diesem Zeitpunkt bekannten 5'-Ende des Gens neue Primer abgeleitet, um eine erneute inverse PCR durchzuführen (Abb. 42E).

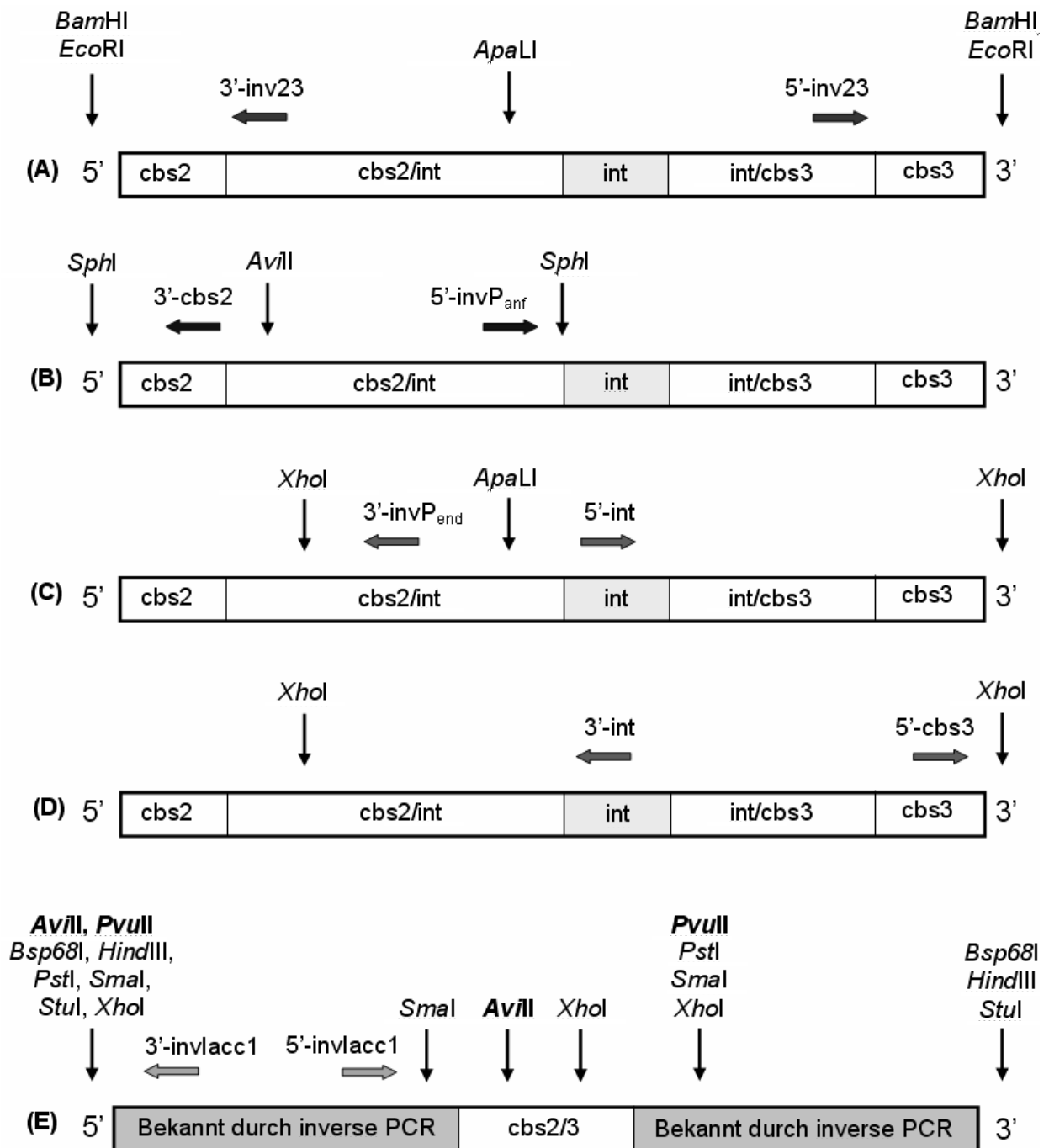


Abb. 42: Schematische Darstellung der inversen PCR zur Amplifikation von *laccl*. Die Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass entweder beide das bekannte Fragment flankierende Regionen amplifiziert wurden (**A**), oder jeweils nur das 5'-Ende (**B** und **E**) oder das 3'-Ende (**C** und **D**). Die Primer wurden innerhalb der zwei Restriktionsschnittstellen des ersten Restriktionsenzym in inverser Orientierung abgeleitet. Ein weiteres Restriktionsenzym mit Schnittstellen zwischen den beiden inversen Primern ermöglichte eine Linearisierung der selbstligierten DNA-Fragmente. Enzyme, mit denen die Amplifikation des 5'-Endes möglich wurde, sind fett gedruckt (**E**).

Inverse PCR zur Auffindung des 3'- oder des 5'-Endes

Um jeweils nur ein unbekanntes Ende des Gens zu amplifizieren, wurden die Primer verwendet, die bereits zur Isolierung der Fragmente cbs2/int und cbs2/3 im Einsatz waren. Ungünstig bei dieser Methode war, dass die Größe der zu erwarteten Fragmente nicht bekannt

war. Die DNA wurde mit *XhoI* und *SphI* restriktionsgespalten und anschließend selbstligiert (Abb. 42B, C, D). Die zirkulären Fragmente wurden mit einer DNA-Konzentration von circa 500 ng in die PCR eingesetzt. Mit dieser Methode gelang es nicht, DNA-Fragmente zu amplifizieren, die größer als circa 400 bp waren (nicht gezeigt). Eine Restriktionsspaltung genomischer DNA mit den verwendeten Enzymen zeigte, dass die Spaltung unvollständig war und demnach sehr große Fragmente erzeugt wurden, die möglicherweise nicht mehr amplifiziert werden konnten.

Inverse PCR zur Auffindung beider flankierender Bereiche

Um beide Bereiche zu amplifizieren, die das bekannte Fragment flankieren, wurden Primer verwendet, die ausgehend von der *cbs2/3*-Sequenz neu abgeleitet worden waren. Genomische DNA von *H. acidophila* wurde mit *BamHI* und *EcoRI* restriktionsgespalten und anschließend selbstligiert (Abb. 42A). Circa 100-200 ng der zirkulären Fragmente wurden in die PCR eingesetzt. Alternativ wurden Laccasegen tragende Eluate hergestellt (3.3.2.1), von denen 20-100 ng in die PCR eingesetzt wurden. Die auf Grund der Southern Blot Analyse erwarteten Fragmentgrößen betrugen etwa 4,5 kb für das *BamHI*-Fragment des *laccI*-Gens (B23-inv) und etwa 7,0-8,0 kb für das *EcoRI*-Fragment des *laccI*-Gens (E23-inv).

Bei Verwendung von Eluat als PCR-Matrize wurden keine Fragmente amplifiziert. Die inverse PCR mit der Primerkombination 5'-/3'-inv23 lieferte sowohl für die *BamHI*-hydrolysierte als auch für die *EcoRI*-hydrolysierte DNA spezifische Signale (Abb. 43, Pfeile), die wie erwartet bei circa 4,0 kb für B23-inv und bei zwischen 7,5 und 8,0 kb für E23-inv lagen. Bei beiden Ansätzen war zu erkennen, dass das jeweilige spezifische Amplifikat bei Verwendung von ungespaltener DNA nicht auftrat, während unspezifische Amplifikate, darunter ein sehr deutliches bei circa 1300 bp, sowohl auf ungespaltener genomischer DNA als auch auf den selbstligierten Fragmenten entstanden. Die beiden spezifischen Fragmente wurden nur amplifiziert, wenn eine Fällung nach der Ligation durchgeführt worden war. Ebenso erwies sich die zweite Restriktionsspaltung als ungünstig für die PCR. Die Kinase-reaktion führte bei B23-inv zu keinem Ergebnis, bei E23-inv zu einem sehr schwachen. Insgesamt war die Amplifikation des E23-inv-Fragmentes auf Grund seiner Größe deutlich schwächer als die des B23-inv-Fragmentes, weshalb in Abbildung 43C zusätzlich eine Ausschnittvergrößerung gezeigt wird. Alle negativen Proben enthielten DNA wie mittels Kontroll-PCR festgestellt wurde. Das B23-inv-Fragment wurde aus dem Gel eluiert, in den Vektor pGem-T Easy kloniert und zum Sequenzieren eingeschickt.

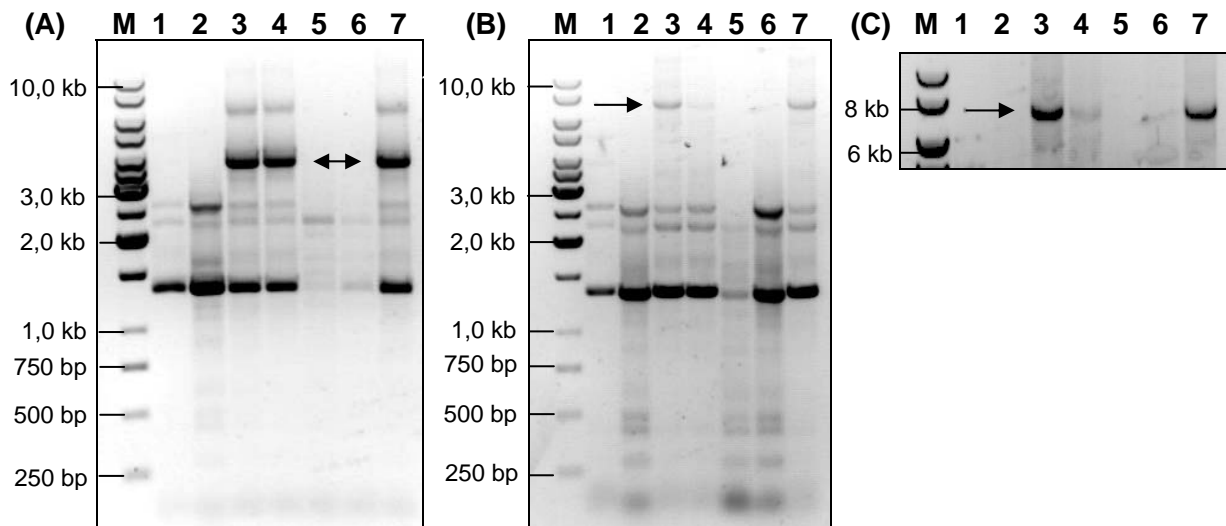


Abb. 43: Amplifikation der Fragmente B23-inv (A) und E23-inv (B und C) mittels inverser PCR. Genomische DNA wurde entweder mit *Bam*HI (A) oder *Eco*RI (B und C) hydrolysiert und anschließend selbstligiert. Nach der Ligation wurde bei einigen Proben eine Fällung durchgeführt (3-7), einige wurden einer Kinasebehandlung unterzogen (6) und andere wurden vor der PCR linearisiert (5). In C ist eine Detailansicht von B gezeigt, um die Banden besser sichtbar zu machen. Die PCR wurde mit dem Advantage-GC Genomic PCR Polymerase-Mix durchgeführt. Eingesetzt wurden 200 ng DNA pro Ansatz. Auf ein 0,8 %iges Gel wurden 5 µl PCR-Ansatz aufgetragen. Die Pfeile markieren die spezifischen Amplifikate. 1 = ungespaltene DNA, 2-7 = mit *Bam*HI oder *Eco*RI gespaltene und selbstligierte DNA, 2 = keine Fällung, 3 = Fällung, 4 = keine Linearisierung, 5 = Linearisierung, 6 = Kinasebehandlung, 7 = keine Kinasebehandlung (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Inverse PCR zur Isolierung des 5'-Endes des *lacc1*-Gen

Zur Amplifikation des 5'-Endes des *lacc1*-Gens wurde genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert, die entweder kein Mal in der bekannten Sequenz schnitten oder aber hinter den abgeleiteten Primern (Abb. 42E). Alle Ansätze wurden zur Hälfte gefällt. Sowohl gefällte als auch ungefällte Proben wurden in einer PCR mit den Primern *cbs2/3* überprüft, bevor sie in die PCR mit den *invlacc1*-Primern eingesetzt wurden. In allen Fällen war ausreichend DNA in den Proben vorhanden. In den Fällen, in denen die Enzyme innerhalb der Sequenz *cbs2/3* schnitten (*Avi*II und *Xho*I), konnte es zu keiner spezifischen Amplifikation kommen. Es wurden allerdings in der Kontroll-PCR ausreichend unspezifische Produkte amplifiziert, um davon auszugehen, dass DNA in den Proben enthalten war.

Die ungefällten Proben lieferten sowohl mit *cbs2/3*- als auch mit den *invlacc1*-Primern viele unspezifische Signale, weshalb nur die gefällten Proben weiterverwendet wurden. In der inversen PCR mit diesen Proben wurden spezifische Banden bei einer Größe von circa 2 kb erhalten, wenn die DNA mit den Enzymen *Avi*II, *Pvu*II und *Xho*I hydrolysiert worden war (Abb. 44, Pfeile). Der Erhalt größerer Produkte wurde durch die Wahl der Elongationszeit von 3 min nahezu ausgeschlossen, da größere Fragmente schwieriger in der Handhabung sind und ein kleines Fragment ausreichte, um das 5'-Ende vollständig zu erhalten. Bei der Einzelprimerkontrolle entstanden

keine Banden für *Avi*II und *Pvu*II, jedoch eine schwache Bande bei *Xho*I (nicht gezeigt), weshalb dieses Fragment nicht sequenziert wurde. Die beiden anderen Banden wurden aus dem Gel eluiert und ohne vorherige Klonierung zum Sequenzieren eingeschickt.

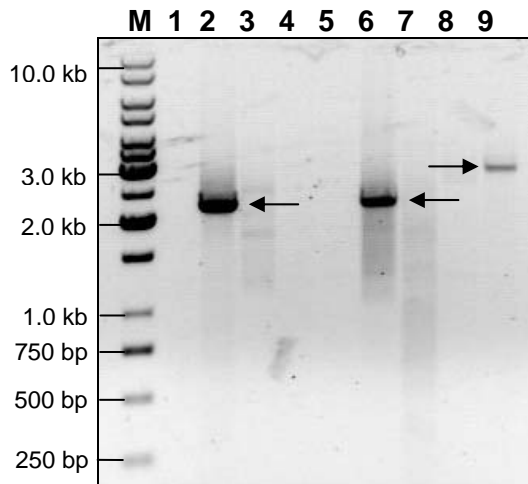


Abb. 44: Amplifikation der Fragmente *lacc1-inv* mittels inverser PCR. Genomische DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert und anschließend selbstligiert. Nach der Ligation wurde eine Fällung durchgeführt. Die PCR wurde mit dem Advantage-GC Genomic PCR Polymerase-Mix (1-8) bzw. der *Taq*-Polymerase (9) durchgeführt. Eingesetzt wurden 200 ng DNA pro Ansatz. Auf ein 0,8 %iges Gel wurden 5 µl PCR-Ansatz aufgetragen. Die Pfeile markieren die spezifischen Signale. 1 = ungesplante DNA, 2 = *Avi*II, 3 = *Bsp*68I, 4 = *Hind*III, 5 = *Pst*I, 6 = *Pvu*II, 7 = *Sma*I, 8 = *Stu*I, 9 = *Xho*I (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

3.3.3.3 Inverse PCR zur Isolierung von *lacc2* (*cbs2/int*)

Um die Sequenz von *lacc2* zu erhalten, wurden Primer ausgehend von der bekannten Sequenz *cbs2/int* abgeleitet (*inv2i*). Abbildung 45 zeigt schematisch die verwendeten Primerbindestellen und Restriktionsenzyme. In diesem Ansatz wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass sie nicht in der bekannten Sequenz schneiden. So erhielt man nach der Selbstligation sowohl die unbekannten Fragmente, die am 5'-Ende als auch die, die am 3'-Ende an das bekannte Fragment anschließen. Die selbstligierten Fragmente konnten mit einem weiteren Restriktionsenzym (*Cfr*9I) linearisiert werden, um die PCR zu vereinfachen.

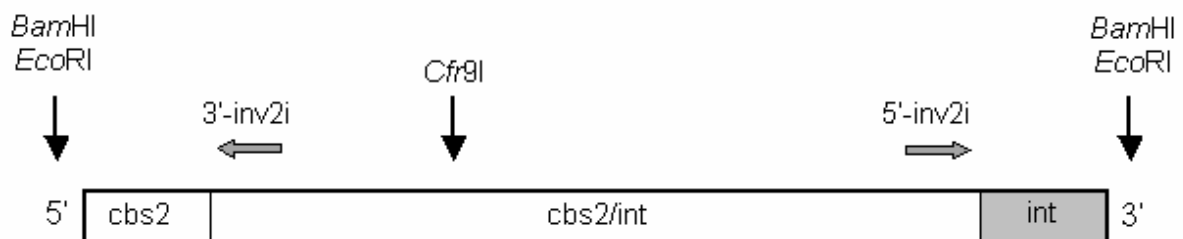


Abb. 45: Schematische Darstellung der inversen PCR zur Amplifikation von *lacc2*. Die Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass beide Regionen amplifiziert wurden, die das bekannte Fragment flankieren. Die Primer wurden innerhalb der zwei Restriktionsschnittstellen des ersten Restriktionsenzym in inverser Orientierung abgeleitet. Ein weiteres Restriktionsenzym mit Schnittstellen zwischen den beiden inversen Primern ermöglichte eine Linearisierung der selbstligierten DNA-Fragmente.

Die auf Grund der Southern Blot Analyse erwarteten Fragmentgrößen betrugen circa 2,0 kb für das *Bam*HI-Fragment des *lacc2*-Gens (*B2i-inv*) und circa 4,0 kb für das *Eco*RI-Fragment des *lacc2*-Gens (*E2i-inv*). Die inverse PCR mit der Primerkombination 5'-/3'-*inv2i* lieferte

sowohl für die *Bam*HI-hydrolysierte als auch für die *Eco*RI-hydrolysierte DNA spezifische Signale, die wie erwartet bei 2,0 kb für B2i-inv und bei fast 4,0 kb für E2i-inv lagen (Abb. 46). Bei beiden Ansätzen war zu erkennen, dass die Primer keine unspezifischen Amplifikate erzeugten. Zudem war zu sehen, dass das B2i-inv-Fragment amplifiziert wurde, unabhängig davon, ob eine Fällung nach der Ligation stattgefunden hatte oder nicht. Zur Amplifikation von E2i-inv hingegen war eine Fällung notwendig. Dagegen war die Amplifikation von E2i-inv unabhängig von einer Linearisierung des DNA-Fragmentes, während das B2i-inv-Fragment nach einer zweiten Restriktionsspaltung nicht mehr amplifiziert wurde. Wurde die nicht linearisierte Probe, von der ausgehend das B2i-inv-Fragment amplifiziert worden war (Abb. 46, Spur 4), einer Spaltung durch *Cfr*9I unterzogen und erneut in die PCR eingesetzt, so trat keine Amplifikation mehr auf. Sowohl für B2i-inv und E2i-inv galt, dass eine Kinasebehandlung vor der Ligation zu keinem Erfolg führte. Insgesamt war die Amplifikation des E2i-inv-Fragmentes auf Grund seiner Größe deutlich schwächer als die des B2i-inv-Fragmentes, da große Fragmente generell schlechter amplifiziert werden als kleine. In Abbildung 46 ist deshalb zusätzlich eine Ausschnittsvergrößerung gezeigt. Alle negativen Proben enthielten DNA wie mittels Kontroll-PCR festgestellt wurde. Die Fragmente B2i-inv und E2i-inv wurden aus dem Gel eluiert, in den Vektor pGem-T Easy kloniert und zum Sequenzieren eingeschickt.

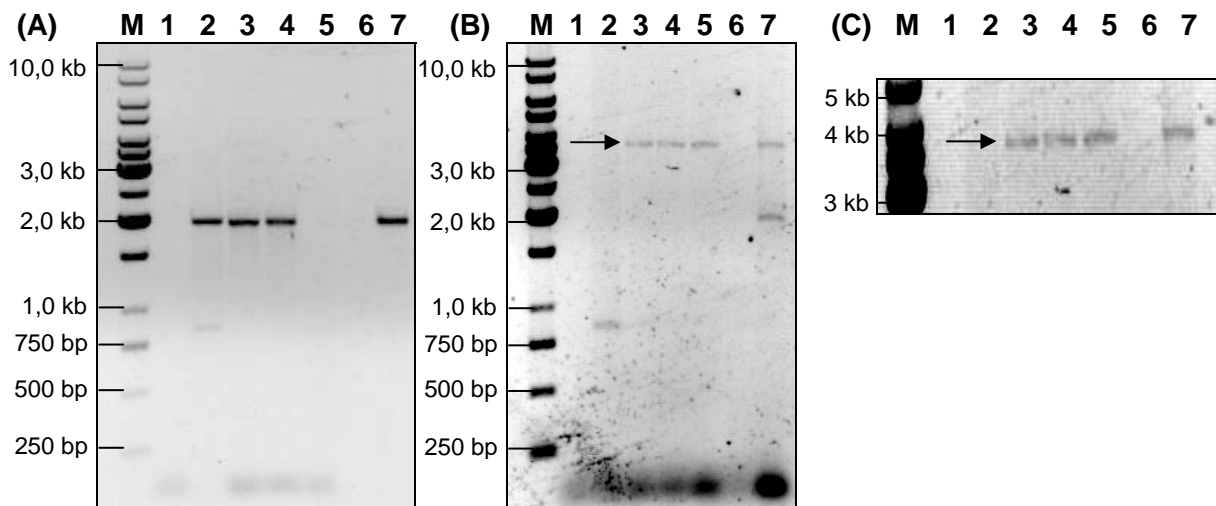


Abb. 46: Amplifikation der Fragmente B2i-inv (A) und E2i-inv (B und C) mittels inverser PCR. Genomische DNA wurde entweder mit *Bam*HI (A) oder *Eco*RI (B und C) hydrolysiert und anschließend selbstligiert. Nach der Ligation wurde bei einigen Proben eine Fällung durchgeführt (3-7), einige wurden einer Kinasebehandlung unterzogen (6) und andere wurden vor der PCR linearisiert (5). In C ist eine Detailansicht von B gezeigt, um die Banden besser sichtbar zu machen. Die PCR wurde mit der *Taq*-Polymerase durchgeführt. Eingesetzt wurden 100-200 ng DNA pro Ansatz. Auf ein 0,8 %iges Gel wurden 5 µl PCR-Ansatz aufgetragen. 1 = ungespaltene DNA, 2-7 = mit *Bam*HI oder *Eco*RI gespaltene und selbstligierte DNA, 2 = keine Fällung, 3 = Fällung, 4 = keine Linearisierung, 5 = Linearisierung, 6 = Kinasebehandlung, 7 = keine Kinasebehandlung (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

3.3.3.4 Inverse PCR zur Isolierung von *lacc3* (int/cbs3)

Um die Sequenz von *lacc3* zu erhalten, wurden Primer ausgehend von der bekannten Sequenz int/cbs3 abgeleitet (inv3i). In Abbildung 47 sind schematisch die verwendeten Primerbindestellen und Restriktionsenzyme dargestellt. In diesem Ansatz wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass sie nicht in der bekannten Sequenz schneiden. So erhielt man nach der Selbstligation sowohl die unbekannten Fragmente, die am 5'-Ende als auch die, die am 3'-Ende an das bekannte Fragment anschließen.

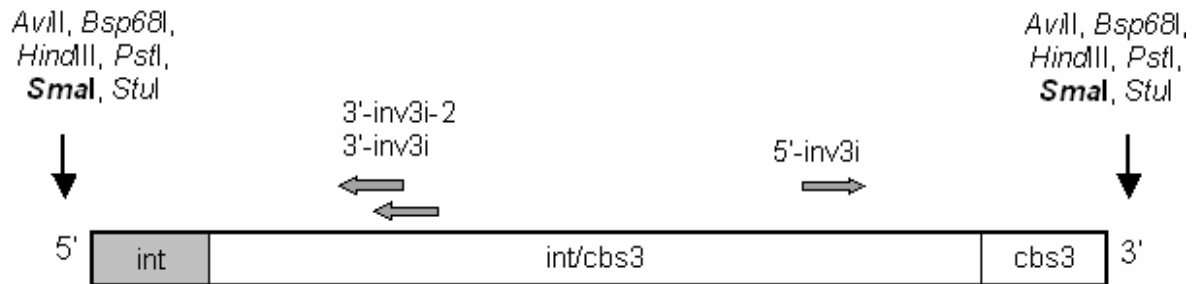


Abb. 47: Schematische Darstellung der inversen PCR zur Amplifikation von *lacc3*. Die Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass beide Regionen, die das bekannte Fragment flankieren, amplifiziert wurden. Die Primer wurden innerhalb der zwei Restriktionsschnittstellen in inverser Orientierung abgeleitet. Fett gedruckt sind Enzyme, deren Verwendung zu einer Amplifikation führten.

Zur Isolierung des *lacc3*-Gens wurde genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert, die nicht in der bekannten Sequenz schnitten (Abb. 47). Alle Ansätze wurden zur Hälfte gefällt. Da die Restriktionsenzyme die gleichen waren, die für die Isolierung des 5'-Ende des *lacc1*-Gens verwendet wurden, war die Überprüfung der Proben mit den Primern cbs2/3 möglich.

Die ungefällten Proben lieferten in der PCR sowohl mit cbs2/3- als auch mit inv3i-Primern viele unspezifische Signale, weshalb nur die gefällten Proben weiterverwendet wurden. Da der Primer 3'-inv3i in der Einzelprimerkontrolle unspezifische Signale lieferte, wurde ein alternativer Primer (3'-inv3i-2) abgeleitet. Mit diesem wurde ein spezifisches Produkt bei einer Größe von circa 1 kb erhalten, wenn die Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym *Sma*I erfolgt war (Abb. 48, Pfeil). Ein schwaches Produkt bei circa 750 bp entstand in der PCR bei den mit *Av*II, *Bsp*68I, *Hind*III und *Pst*I hydrolysierten Proben. Da dieses Produkt die gleiche Höhe aufwies wie ein sehr schwaches Signal bei ungespaltener DNA, war davon auszugehen, dass es sich um eine unspezifische Bande handelte, obwohl die Einzelprimerkontrollen alle negativ waren. Das Fragment A3i-inv wurde trotzdem zusammen mit dem Fragment Sm3i-inv aus dem Gel eluiert und ohne vorherige Klonierung zum Sequenzieren geschickt, da eine spezifische Amplifikation nicht ausgeschlossen werden konnte. Der Erhalt größerer Produkte wurde durch die Wahl der Elongationszeit von 3 min nahezu ausgeschlossen.

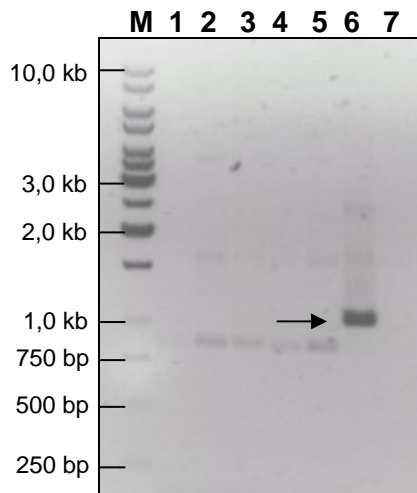


Abb. 48: Amplifikation der Fragmente 3i-inv mittels inverser PCR. Genomische DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert und anschließend selbstligiert. Nach der Ligation wurde eine Fällung durchgeführt. Die PCR wurde mit dem Advantage-GC Genomic PCR Polymerase durchgeführt. Eingesetzt wurden 200 ng DNA pro Ansatz. Auf ein 0,8 %iges Gel wurden 5 µl PCR-Ansatz aufgetragen. Der Pfeil markiert das spezifische Amplifikat. 1 = ungespaltene DNA, 2-7 = gespaltene und selbstligierte DNA, 2 = *AviII*, 3 = *Bsp68I*, 4 = *HindIII*, 5 = *PstI*, 6 = *SmaI*, 7 = *StuI* (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

3.3.3.5 Inverse PCR zur Isolierung von *lacc4* (*cbs1/2*)

Um die Sequenz von *lacc4* zu erhalten, wurden Primer ausgehend von der bekannten Sequenz *cbs1/2* (*inv12*) abgeleitet. In Abbildung 49 sind schematisch die verwendeten Primerbindestellen und Restriktionsenzyme dargestellt. In diesem Ansatz wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass sie nicht in der bekannten Sequenz schneiden. So erhielt man nach der Selbstligation sowohl die unbekannten Fragmente, die am 5'-Ende als auch die, die am 3'-Ende an das bekannte Fragment anschließen.

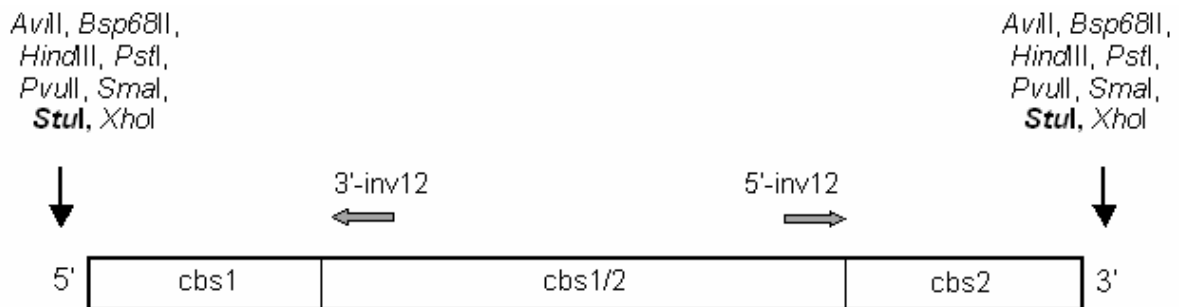


Abb. 49: Schematische Darstellung der inversen PCR zur Untersuchung von *lacc4*. Die Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass beide Regionen, die das bekannte Fragment flankieren, amplifiziert wurden. Die Primer wurden innerhalb der zwei Restriktionsschnittstellen in inverser Orientierung abgeleitet. Fett gedruckt sind Enzyme, deren Verwendung zu einer Amplifikation führten.

Zur Isolierung des *lacc4*-Gens wurde genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen hydrolysiert, die nicht in der bekannten Sequenz schnitten (Abb. 49). Alle Ansätze wurden zur Hälfte gefällt. Da die Restriktionsenzyme die gleichen waren, die für die Auffindung des 5'-Ende des *lacc1*-Gens verwendet wurden, war die Überprüfung der Proben mit den Primern *cbs2/3* möglich. Die ungefällten Proben lieferten in der PCR sowohl mit *cbs2/3*-als auch mit *inv12*-Primern viele unspezifische Signale, weshalb nur die gefällten Proben weiterverwendet wurden. Der Erhalt größerer Produkte wurde durch die Wahl der Elongationszeit von 3 min nahezu ausgeschlossen. Sowohl unter Verwendung der

Taq-Polymerase als auch des Advantage GC Genomic PCR Polymerase Mix wurde nur ein Signal bei der durch *Stu*I-hydrolysierten Probe mit einer Größe von circa 400 bp erhalten (Abb. 50, Pfeil). Da die Einzelprimerkontrollen negativ waren, wurde das Fragment aus dem Gel eluiert, in den pGem-T Easy kloniert und zum Sequenzieren geschickt.

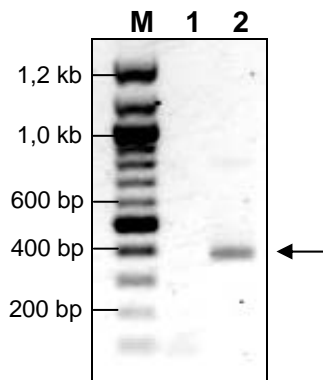


Abb. 50: Amplifikation des Fragments *Stu*12-inv mittels inverser PCR. Genomische DNA wurde mit *Stu*I hydrolysiert und anschließend selbstligiert. Nach der Ligation wurde eine Fällung durchgeführt. Die PCR wurde mit dem Advantage-GC Genomic PCR Polymerase-Mix bzw. der *Taq*-Polymerase durchgeführt. Eingesetzt wurden 200 ng DNA pro Ansatz. Auf ein 0,8 %iges Gel wurden 5 µl PCR-Ansatz aufgetragen. Der Pfeil markiert das spezifische Amplifikat. 1 = ungespaltene DNA, 2 = *Stu*I-gespaltene und selbstligierte DNA (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

3.3.3.6 Sequenzierstrategie für die Laccasegene

Folgende mittels inverser PCR amplifizierte Fragmente wurden sequenziert:

1. Für *lacc1* die Fragmente B23-inv, Alacc1-inv und Placc1-inv. Diese Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Avi*II und *Pvu*II und den Primerkombinationen inv23 und invlacc1 erhalten.
2. Für *lacc2* die Fragmente B2i-inv und E2i-inv. Diese Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI und der Primerkombination inv2i erhalten.
3. Für *lacc3* die Fragmente A3i-inv und Sma3i-inv. Diese Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Avi*II und *Sma*I und der Primerkombination inv3i erhalten.
4. Für *lacc4* das Fragment *Stu*12-inv. Dieses Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *Stu*I und der Primerkombination inv12 erhalten.

Die Fragmente A3i-inv, Sma3i-inv und *Stu*12-inv waren klein genug, um direkt vollständig sequenziert werden zu können. Verwendet wurden entweder Primer, die an die Sequenz des Vektors binden, oder bei direkter Sequenzierung des PCR-Produktes die Primer, die für die PCR verwendet worden waren. Die Fragmente B23-inv, Alacc1-inv, Placc1-inv, B2i-inv und E2i-inv waren mit über 1,5 kb zu groß, um durch Sequenzierung vom 5'- und vom 3'-Ende vollständig sequenziert werden zu können. Deshalb wurden die Fragmente ansequenziert, so dass ausgehend von diesen nun bekannten Sequenzen interne Sequenzierprimer abgeleitet werden konnten, mit deren Hilfe die Sequenzierung fortgesetzt wurde. Diese Sequenzierprimer sind in Tabelle 7c angegeben. Insgesamt lieferten diese Sequenzierungen die vollständigen Laccasegenesequenzen von *lacc1* und *lacc2* und Teilsequenzen von *lacc3* und *lacc4* erhalten.

3.4 Sequenzanalyse der Laccasegene und der von ihnen kodierten hypothetischen Proteine

Die Sequenzanalyse der vollständigen Laccasegene *lacc1* und *lacc2* sowie der Fragmente der Gene *lacc3* und *lacc4* und die Analyse der daraus resultierenden Proteinsequenzen erfolgte computergestützt. Die DNA-Sequenzen wurden hinsichtlich ihres GC-Gehalts, der Anteile der vier Basen an der Gesamtsequenz und der Präferenz bei der Kodierung der Aminosäuren untersucht (Codon Usage). Zudem wurde der 5'-Bereich der Gene nach möglichen Promotorstrukturen durchsucht. Anschließend wurden die Gensequenzen in Proteinsequenzen umgeschrieben und diese hypothetischen Proteine in Hinsicht auf ihre Aminosäurezusammensetzung, das Vorhandensein einer Signalsequenz und die Hydrophobizitätsverteilung der Sequenzen analysiert. Da vorhandene Introns nur über Sequenzvergleiche entfernt wurden, sind die Proteinsequenzen als vorläufig zu betrachten. Die Homologien der Laccasen von *H. acidophila* untereinander wurden ebenso untersucht wie die Homologien zu anderen bekannten Laccasen.

3.4.1 Eigenschaften der Laccasegensequenzen

Der GC-Gehalt und der Anteil der einzelnen Basen wurden jeweils für die gesamte vorhandene Gensequenz und für die proteinkodierende Gensequenz bestimmt. Der GC-Gehalt lag bei allen Sequenzen bei etwa 60 % (Tab. 17). Eine Ausnahme war hier der bekannte Abschnitt des *lacc4*-Gens mit einem GC-Gehalt von nur 54,5 %. Betrachtete man jedoch nur den Teil von *lacc1*, der dem bekannten Teil von *lacc4* entspricht, so lag der GC-Gehalt auch hier nur bei circa 56,6 %, was dafür spricht, dass der Anfang der untersuchten Laccasegene generell einen niedrigeren GC-Gehalt aufweist als der Rest der Gene. Die Anteile der Basen betrugen circa 17,8-21,8 % für T, 18,6-23,7 % für A, 24,0-29,1 % für G und 25,4-37,9 % für C.

Tab. 17: GC-Gehalt der Laccasegene und Anteil der Basen an der Gesamtsequenz. Die Angaben beziehen sich immer auf den bekannten Abschnitt der Gene, wenn möglich beginnend mit dem Startcodon. Sie sind angegeben für die Sequenz mit (+I) und ohne Introns (-I) (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Gen	% A		% C		% G		% T		GC-Gehalt	
	+I	-I	+I	-I	+I	-I	+I	-I	+I	-I
<i>lacc1</i>	21,17	21,51	34,28	34,51	26,08	26,22	18,47	17,76	60,4	60,7
<i>lacc2</i>	19,99	18,77	36,03	37,88	24,41	24,98	19,58	18,37	60,4	62,9
<i>lacc3</i>	22,15	21,86	35,80	36,38	24,02	23,98	18,02	17,78	59,8	60,4
<i>lacc4</i>	23,72		25,43		29,10		21,76		54,5	

Der genetische Code ist weitgehend universell, aber die Verwendung der alternativen Codons zur Kodierung einer einzelnen Aminosäure kann sich bei verschiedenen Organismen vonein-

ander unterscheiden. Tabelle 18 gibt eine Übersicht darüber, welchen Anteil die einzelnen Codons an den Laccasegenen von *H. acidophila* haben und welche Codons bevorzugt zur Kodierung einer bestimmten Aminosäure verwendet werden. Für die meisten Aminosäuren ist das bevorzugte Codon bei allen vier Laccasegenen gleich (Ala, Cys, Asp, Phe, Gly, Lys, Asn, Tyr) oder unterscheidet sich nur bei *lacc4* (His, Ile, Gln, Arg, Thr). Die Aminosäuren Glutamat und Serin werden bei *lacc1* und *lacc2* von einem anderen Codon bevorzugt kodiert als bei *lacc3* und *lacc4*. Bei der Kodierung von Valin unterschied sich *lacc1* und bei der Kodierung von Prolin *lacc2* von den anderen Laccasegenen. Die Aminosäure Leucin wurde nur bei *lacc2* und *lacc3* von dem gleichen Codon bevorzugt kodiert. GC-reiche Codons wurden bevorzugt zur Kodierung verwendet, was mit dem hohen GC-Gehalt der Sequenzen konform ist.

Tab. 18: Anteile der zur Aminosäurekodierung verwendeten Codons an der Gesamtsequenz der Laccasegene von *H. acidophila*. Angegeben sind die Häufigkeit und der prozentuale Anteil der Codons sowohl an der Gesamtheit aller Codons (in Klammern) als auch an den für dieselbe Aminosäure kodierenden Codons. Die Codons sind nach Aminosäuren geordnet für die sie kodieren. Für jede Aminosäure sind die Gesamtanzahl im Protein und der prozentuale Anteil an der Proteinzusammensetzung angegeben. Für Lacc3 und Lacc4 wurden keine Stopcodons gefunden, weil die Sequenz nicht vollständig ist (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

AS	Codon	Lacc1		Lacc2		Lacc3		Lacc4	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Ala (A)	GCT	1	2,1 (0,2)	2	6,1 (0,4)	1	3,7 (0,2)	5	38,5 (3,7)
	GCC	20	42,6 (3,4)	23	69,7 (4,6)	12	44,4 (2,9)	4	30,8 (2,9)
	GCA	8	17,0 (1,3)	1	3,0 (0,2)	5	18,5 (1,2)	2	15,4 (1,5)
	GCG	18	38,3 (3,1)	7	21,2 (1,4)	9	33,3 (2,2)	2	15,4 (1,5)
Gesamt		47	8,0	33	6,6	27	6,5	13	9,6

Cys (C)	TGT	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	TGC	5	100 (0,8)	6	100 (1,2)	5	100 (1,2)	1	100 (0,7)
Gesamt		5	0,8	6	1,2	5	1,2	1	0,7

Asp (D)	GAT	10	32,3 (1,7)	6	19,4 (1,2)	9	33,3 (2,2)	3	37,5 (2,2)
	GAC	21	67,7 (3,5)	25	80,6 (5,0)	18	66,6 (4,4)	5	62,5 (3,7)
Gesamt		31	5,2	31	6,2	27	6,6	8	5,9

Glu (E)	GAA	5	33,3 (0,8)	1	6,3 (0,2)	8	72,7 (2,0)	4	50,0 (2,9)
	GAG	10	66,6 (1,7)	15	93,8 (3,0)	3	27,3 (0,7)	4	50,0 (2,9)
Gesamt		15	2,5	16	3,2	11	2,7	8	5,8

Phe (F)	TTT	1	5,9 (0,2)	1	5,0 (0,2)	3	15,8 (0,7)	3	42,9 (2,2)
	TTC	16	94,1 (2,7)	19	95,0 (3,8)	16	84,2 (3,9)	4	57,1 (2,9)
Gesamt		17	2,9	20	4,0	19	4,6	7	5,1

AS	Codon	Lacc1		Lacc2		Lacc3		Lacc4	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Gly (G)	GGT	6	10,7 (1,0)	11	23,9 (2,2)	3	10,7 (0,7)	0	0,0
	GGC	40	71,4 (6,7)	32	69,6 (6,4)	18	64,3 (4,4)	8	47,1 (5,9)
	GGA	3	5,4 (0,5)	2	4,3 (0,4)	5	17,9 (1,2)	6	35,3 (4,4)
	GGG	7	12,5 (1,2)	1	2,2 (0,2)	2	7,1 (0,5)	3	17,6 (2,2)
Gesamt		56	9,4	46	9,2	28	6,8	17	12,5

His (H)	CAT	5	25,0 (0,8)	1	6,7 (0,2)	1	11,1 (0,2)	6	60,0 (4,4)
	CAC	15	75,0 (2,5)	14	93,3 (2,8)	8	88,9 (2,0)	4	40,0 (2,9)
Gesamt		20	3,3	15	3,0	9	2,2	10	7,3

Ile (I)	ATT	11	30,6 (1,8)	5	18,5 (1,0)	6	26,1 (1,5)	3	60,0 (2,2)
	ATC	25	69,4 (4,2)	22	81,5 (4,4)	17	73,9 (4,2)	1	20,0 (0,7)
	ATA	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	20,0 (0,7)
Gesamt		36	6,0	27	5,4	23	5,7	5	3,6

Lys (K)	AAA	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	33,3 (0,7)
	AAG	13	100 (2,2)	8	100 (1,6)	3	100 (0,7)	2	66,6 (1,5)
Gesamt		13	2,2	8	1,6	3	0,7	3	2,2

Leu (L)	TTA	2	0,3 (0,3)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	TTG	8	19,5 (1,3)	2	4,8 (0,4)	1	4,5 (0,2)	3	33,3 (2,2)
	CTT	2	2,4 (0,3)	2	4,8 (0,4)	2	9,1 (0,5)	2	22,2 (1,5)
	CTC	15	34,1 (2,5)	28	66,7 (5,6)	14	63,6 (3,4)	0	0,0
	CTA	2	4,9 (0,3)	0	0,0	0	0,0	2	22,2 (1,5)
	CTG	16	39,0 (2,7)	10	23,8 (2,0)	5	22,7 (1,2)	2	22,2 (1,5)
Gesamt		45	7,4	42	8,4	22	5,3	9	6,7

Met (M)	ATG	16	100 (2,7)	11	100 (2,2)	11	100 (2,7)	3	100 (2,2)
----------------	-----	----	------------------	----	------------------	----	------------------	---	------------------

Asn (N)	AAT	3	7,0 (0,5)	1	3,0 (0,2)	3	11, (0,7)	1	14,3 (0,7)
	AAC	40	93,0 (6,7)	32	96,9 (6,4)	24	88,9 (5,9)	6	85,7 (4,4)
Gesamt		43	7,2	33	6,6	27	6,6	7	5,1

Pro (P)	CCT	7	15,9 (1,2)	3	9,1 (0,6)	3	9,4 (0,7)	1	14,3 (0,7)
	CCC	17	38,6 (2,9)	22	66,7 (4,4)	11	34,4 (2,7)	2	28,6 (1,5)
	CCA	2	4,5 (0,3)	0	0,0	2	6,3 (0,5)	1	14,3 (0,7)
	CCG	18	40,9 (3,0)	8	24,2 (1,6)	16	50,0 (3,9)	3	42,9 (2,2)
Gesamt		44	7,4	33	6,6	32	7,8	7	5,1

AS	Codon	Lacc1		Lacc2		Lacc3		Lacc4	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Gln (Q)	CAA	6	28,6 (1,0)	2	7,7 (0,4)	6	28,6 (1,5)	2	100 (1,5)
	CAG	15	71,4 (2,5)	24	92,3 (4,8)	15	71,4 (3,7)	0	0,0
Gesamt		21	3,5	26	5,2	21	5,2	2	1,5

Arg (R)	CGT	0	0,0	2	22,2 (0,4)	1	7,1 (0,2)	0	0,0
	CGC	10	52,6 (1,7)	7	77,8 (1,4)	8	57,1 (2,0)	1	16,7 (0,7)
	CGA	5	26,3 (0,8)	0	0,0	0	0,0	2	33,3 (1,5)
	CGG	1	5,3 (0,2)	0	0,0	2	14,3 (0,5)	0	0,0
	AGA	1	5,3 (0,2)	0	0,0	1	7,1 (0,2)	2	33,3 (1,5)
	AGG	2	10,5 (0,3)	0	0,0	2	14,3 (0,5)	1	16,7 (0,7)
Gesamt		19	3,2	9	1,8	14	38,9 (3,4)	6	4,4

Ser (S)	TCT	3	7,3 (0,5)	3	8,8 (0,6)	1	2,8 (0,2)	2	22,2 (1,5)
	TCC	12	29,3 (2,0)	13	38,2 (2,6)	14	38,9 (3,4)	1	11,1 (0,7)
	TCA	2	4,9 (0,3)	0	0,0	0	0,0	1	11,1 (0,7)
	TCG	13	31,7 (2,2)	9	26,5 (1,8)	6	16,7 (1,5)	2	22,2 (1,5)
	AGT	2	4,9 (0,3)	1	2,9 (0,2)	0	0,0	0	0,0
	AGC	9	22,0 (1,5)	8	23,5 (1,6)	15	41,7 (3,7)	3	33,3 (2,2)

Thr (T)	ACT	3	6,7 (0,5)	4	11,4 (0,8)	0	0,0	0	0,0
	ACC	27	60,0 (4,5)	22	62,9 (4,4)	20	58,8 (4,9)	1	33,3 (0,7)
	ACA	3	6,7 (0,5)	1	2,9 (0,2)	2	5,9 (0,5)	2	66,6 (1,5)
	ACG	12	26,7 (2,0)	8	22,9 (1,6)	12	35,3 (2,9)	0	0,0
Gesamt		45	7,5	35	7,0	34	8,3	3	2,2

Val (V)	GTT	2	5,1 (0,3)	6	16,2 (1,2)	3	11,1 (0,7)	2	25,0 (1,5)
	GTC	15	38,5 (2,5)	24	64,9 (4,8)	15	55,6 (3,7)	3	37,5 (2,2)
	GTA	3	7,7 (0,5)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	GTG	19	48,7 (3,2)	7	18,9 (1,4)	9	33,3 (2,2)	3	37,5 (2,2)
Gesamt		39	6,5	37	7,4	27	6,6	8	5,9

Trp (W)	TGG	10	100 (1,7)	15	100 (3,0)	7	100 (1,7)	5	100 (3,7)
----------------	-----	----	------------------	----	------------------	---	------------------	---	------------------

Tyr (Y)	TAT	4	12,9 (0,7)	0	0,0	2	8,0 (0,5)	2	40,0 (1,5)
	TAC	27	87,1 (4,5)	21	100 (4,2)	23	92,0 (5,6)	3	60,0 (2,2)
Gesamt		31	5,2	21	4,2	25	6,1	5	3,7

AS	Codon	Lacc1		Lacc2		Lacc3		Lacc4	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Stop	TAA	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	TAG	1	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	TGA	0	0,0	1	0,2	0	0,0	0	0,0

3.4.2 Annotierte Gensequenzen

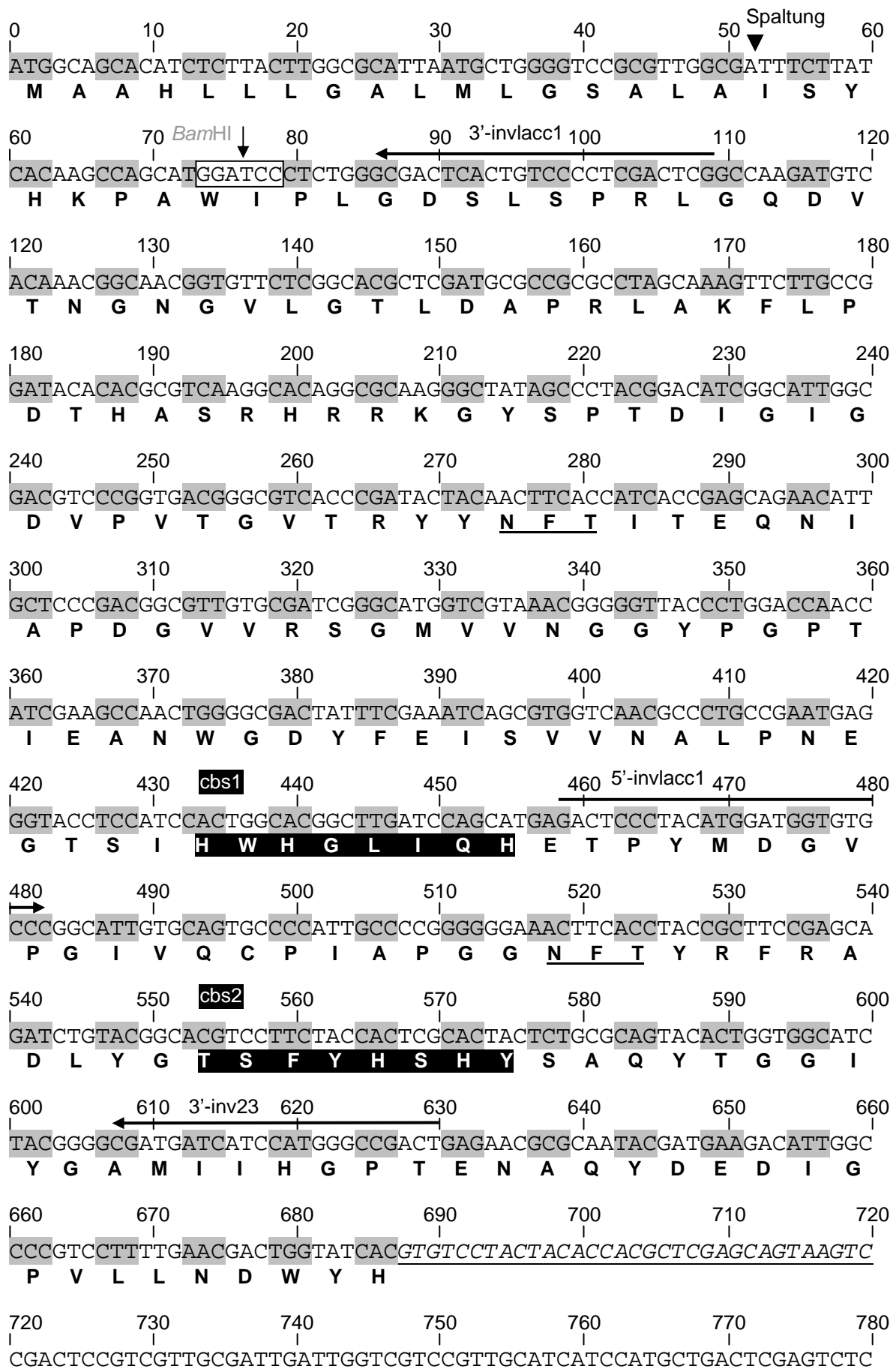
Die erhaltenen Gensequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramms BioEdit in Proteinsequenzen umgeschrieben. Durch Vergleiche mit anderen Sequenzen wurden Introns gefunden und aus der Sequenz entfernt. Promotorstrukturen wurden an Hand von Konsensussequenzen erkannt. Die Lage der Introns und die einzelnen Promotorstrukturen sind hypothetisch. Mit Sicherheit können diese ebenso wie das Startcodon erst nach einem Vergleich der cDNA der entsprechenden Gene mit den Gensequenzen auf genomischer DNA-Ebene angegeben werden.

3.4.2.1 Annotierte Sequenz des Gens *lacc1*

Die DNA-Sequenz des *lacc1*-Gens wurde vollständig aufgeklärt. Das Gen umfasst 1998 bp und enthält drei hypothetische Introns mit einer Größe von 120, 69 und 24 bp. Da die Laccasegene vor allem an den Enden kaum konserviert sind, lässt sich das Startcodon durch Sequenzvergleiche nur schwer ausfindig machen. Durch Sequenzvergleiche, aufgefundene Promotorstrukturen und Lage einer Signalsequenz wurde das Startcodon gewählt (Abb. 51) gezeigt. Das resultierende Protein umfasst 594 Aminosäuren. Umgerechnet ergibt sich ein Molekulargewicht von 64,50 kDa. Wenn die Signalsequenz an der angegebenen Stelle gespalten wird, so ergibt sich umgerechnet eine Größe von 577 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 62,86 kDa. Das hypothetische Protein enthält 9 mögliche N-Glykosylierungsstellen nach dem Muster N-X-T oder N-X-S (Nitalazar *et al.*, 2005), wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann.

Kodierender Bereich des *lacc1*-Gens

In Abbildung 51 ist der kodierende Bereich des *lacc1*-Gens mit den hypothetischen Introns dargestellt. Die Schnittstelle für *Bam*HI, das zur Herstellung der Matrize für die inverse PCR verwendet wurde, ist eingezeichnet. Die Sequenz stromaufwärts dieser Schnittstelle wurde durch PCR mit den inversen Primern invlacc1 erhalten. Der Primer L1K zusammen mit 5'-inv23 diente zur Kontrolle eines Sequenzabschnittes. Die inversen Primer sind ebenfalls eingezeichnet.



780 790 800 810 820 830 840
AGAGCCATGGCCCCAATTTCTGCCAAGCTGCCTCCCCCTCAGTCGAATAACAACCTTGATC
L P P P Q S N N N L I

840 850 860 870 880 890 900
AACGGCAAGATGAACGTAAGTAGACAGCGAGTCCCTTTGCTTCCGACGACTTGCTTACAC
N G K M N V S R Q R

900 910 920 930 940 950 960
TAGACGCAGTATCCCTGCGCGAACGCTACCGGCCTTCAGTGCACGCCCACGCGCGGCATC
C T P N A G I

960 970 980 990 1000 1010 1020
TCCAAGTTTACCTTCCAATCGGGCAAGACCTACCGCCTACGCTGATCAACGCCGGCGCC
S K F T F Q S G K T Y R L R L I N A G A

1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
GAGGGCATGCAAAAGTTTCAGCATTGACGGCCATACCATGACCGTGATTGCGAACGATTTTC
E G M Q K F S I D G H T M T V I A N D F

1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140
GTGCCGTTGAAGCCCTACAGACAGACGTCGTGACGCTCGGCATTGGACAACGGTTCGGAC
V P L K P Y Q T D V V T L G I **G Q R S D**

1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
ATCATCGTCAACCGCGACCGGCAAGGCCGGCCAGTCTGACTGGATGCGCTCGGATCTCGGC
I I V T A T G K A G Q S Y W M R S D L G

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
CTCAACGCCCTGTCCAATCCGGCAGGCTGCACCAACAACGACGGTGTCTCGCCTCTGGCG
L N A L S N P A G C T N N D G V S P L A

1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
CTGCGAGCCATCTACTACGAAGGCGCCGACACCAACTCCGTCACCACCAACTCCACC
L A A I Y Y E G A D T N S V P T T N S T

1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380
GTGCCCAGTCCAGCATCCAGTCGTGCATGAACGACCCGCTCAACATGACCGTACCCTAC
V P E S S I Q S C M N D P L N M T V P Y

1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
TACAGCCTCACGCCCTCCACCACGCCCCGCCATGTCGCAAAACATCGACATCACCTTTGCG
Y S L T P S T T P A M S Q N I D I T F A

1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
AGCAACGGCACCAACTACCTCTTCTACATGAACAACCTCCACCTTCCGCGCCGACTACAAC
S N G T N Y L F Y M N N S T F R A D Y N

1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
GACCCCATCCTGCTCGAAGCGAAGCTCGGGCAGACCGTGTTCCCGGCGGAGGAGAACGTC
D P I L L E A K L G Q T V F P A E E N V

5'-inv23

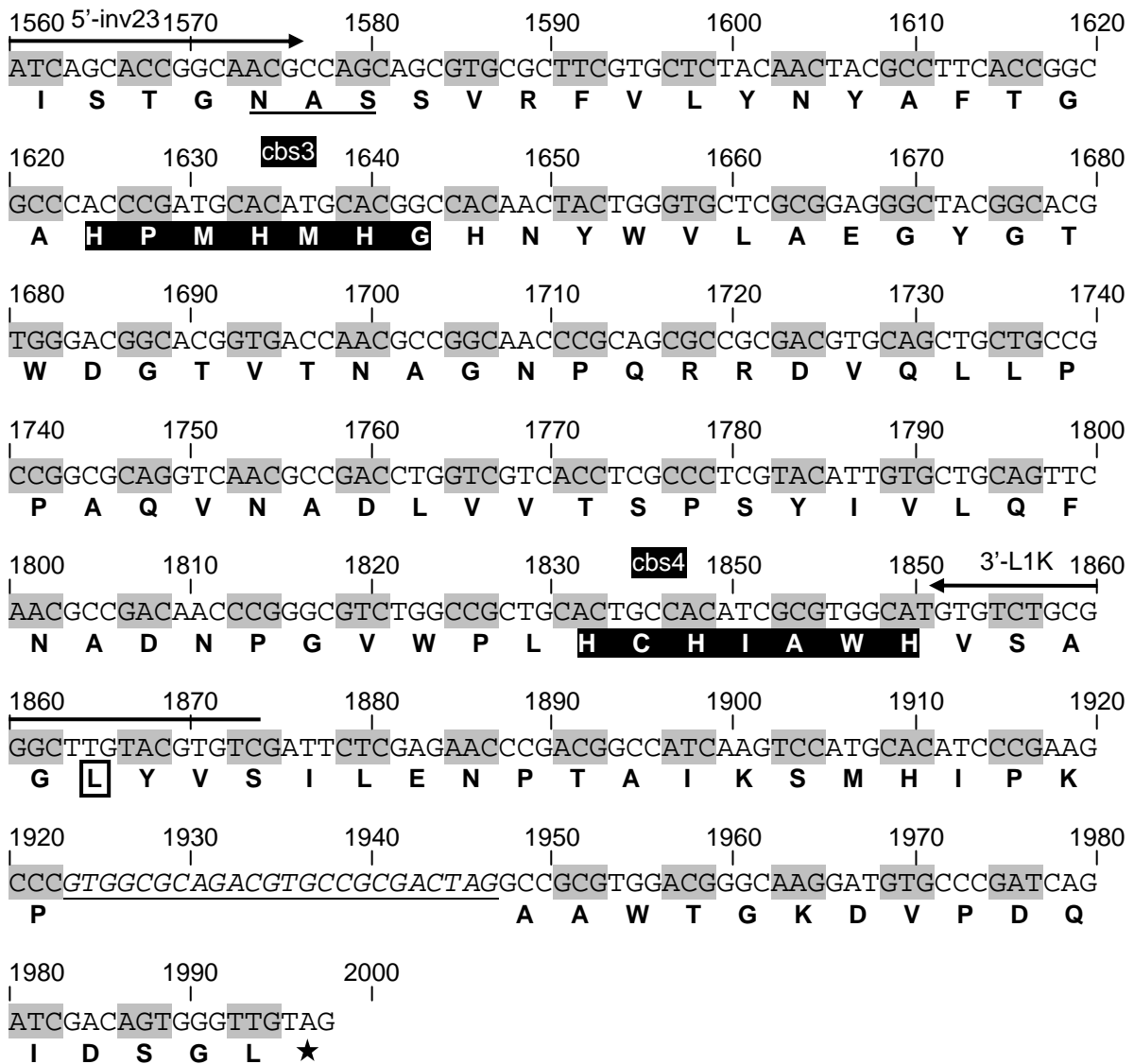


Abb. 51: Annotierte Gensequenz des Laccasegens *lacc1* (AY351908). Dargestellt ist die vollständige Sequenz des *lacc1*-Gens, das ausgehend von genomischer DNA amplifiziert worden ist. Eingezeichnet sind die cbs-Regionen und die int-Region (schwarz hinterlegt), sowie die Primer, die für die inverse PCR verwendet wurden. Der Primer L1K wurde zusammen mit 5'-inv23 für eine Kontroll-PCR verwendet. Durch Sequenzvergleiche wurden hypothetische Introns gefunden, die kursiv und unterstrichen dargestellt sind. Der Pfeil zeigt die Schnittstelle, an der die N-terminale Signalsequenz für den Export des Proteins abgespalten wird (▼). Eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI ist eingezeichnet. Potenzielle N-Glykosylierungsstellen sind unterstrichen. Eingrahmt ist eine für das Redoxpotenzial wichtige Aminosäure.

5'- und 3'-terminale Bereiche des *lacc1*-Gens

Der 5'-terminale Bereich des *lacc1*-Gens beherbergt den Promotor des Gens. In Abbildung 52 ist der Sequenzabschnitt dargestellt, der 5'-terminal vor dem hypothetischen Startcodon liegt. Eingezeichnet wurden einige Strukturelemente, die auf einen Promotor hinweisen könnten (für eine genaue Erläuterung von Promotorstrukturen mit ihren Konsensussequenzen siehe Diskussion). Der dargestellte Abschnitt enthält ein MRE-Element, welches genau der Konsensussequenz nach Galhaup *et al.* (2002) entspricht. Desweiteren konnten in beiden

Orientierungen CAAT-Boxen gefunden werden, wobei bei diesen nur die vier farbig hinterlegten Basenpaare konserviert sind. Die CAAT-Box zwischen den beiden Inr-Elementen ist vermutlich kein Regulationselement, da sie zu dicht am Transkriptionsstartpunkt liegt. Ein CACCC-Element ist vorhanden sowie mehrere GC-reiche Abschnitte, welche GC-Boxen enthalten können. Die GC-Box CCGCC entspricht als einzige vollständig der Konsensussequenz. Das TGGGTT-Motiv kommt nach Soden & Dobson (2003) häufig in Laccasegenpromotoren vor. Zusätzlich wurden zwei hypothetische TATA-Boxen gefunden und zwei dazugehörige Inr-Elemente, die einen Transkriptionsstart anzeigen. Die zweite TATA-Box, die näher am Startcodon liegt, entspricht deutlicher der Konsensussequenz als die andere. Eine Ribosomenbindestelle, die der Konsensussequenz entspricht, konnte nicht in der Nähe des Startcodons gefunden werden.

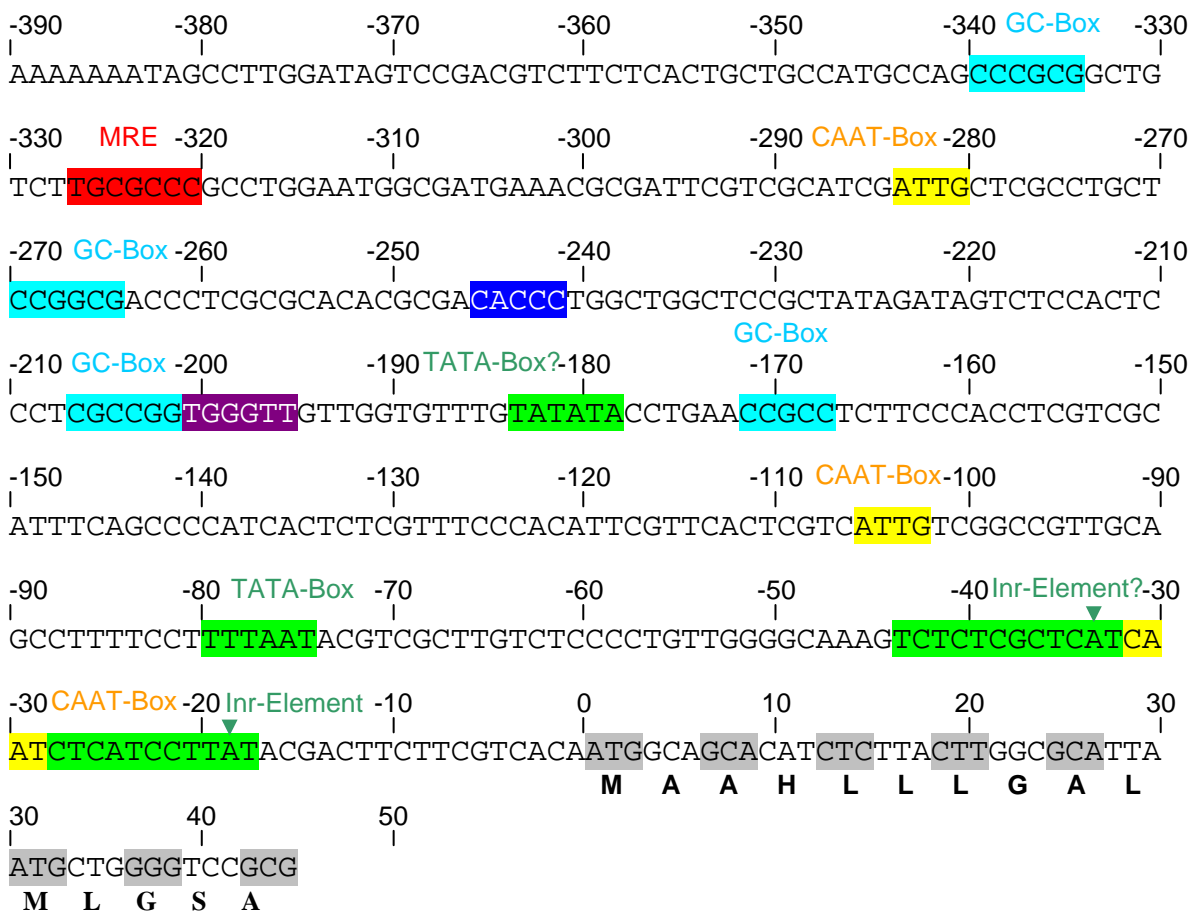


Abb. 52: 5'-terminaler Bereich des *lacc1*-Gens. Eingezeichnet sind mögliche Promotorelemente. Während die CAAT-Boxen eindeutig zu identifizieren waren, weichen alle ermittelten GC-Boxen und Promotorelemente von der Konsensussequenz ab. Das MRE-Element entspricht der Konsensussequenz. Zusätzlich ist ein TGGGTT-Motiv eingezeichnet, das für pilzliche Promotoren spezifisch sein soll. Der Pfeil über dem Inr-Element markiert den möglichen Transkriptionsstartpunkt. Das Fragezeichen kennzeichnet diejenige Kombination aus TATA-Box und Inr-Element, die den Konsensussequenzen schlechter entspricht.

Das bekannte 3'-terminale Ende von *laccI* wurde auf mögliche Polyadenylierungsstellen hin untersucht (Abb. 53). Es wurden zwei Sequenzabschnitte gefunden, die der Konsensussequenz ähnlich sind, jedoch nicht vollständig mit ihr übereinstimmen. Eine Destabilisierungssequenz gemäß der Konsensussequenz wurde gefunden und eingezeichnet.

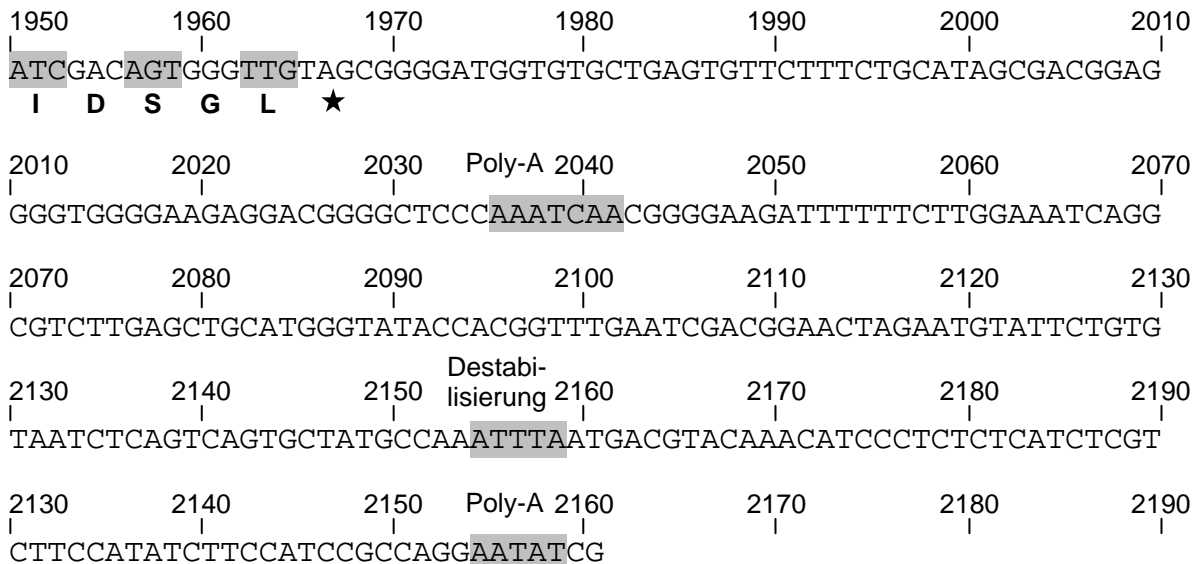


Abb. 53: 3'-terminaler Bereich des *laccI*-Gens. Eingezeichnet sind mögliche Destabilisierungssequenzen und Polyadenylierungsstellen (Poly-A). Letzere weichen von der Konsensussequenz ab.

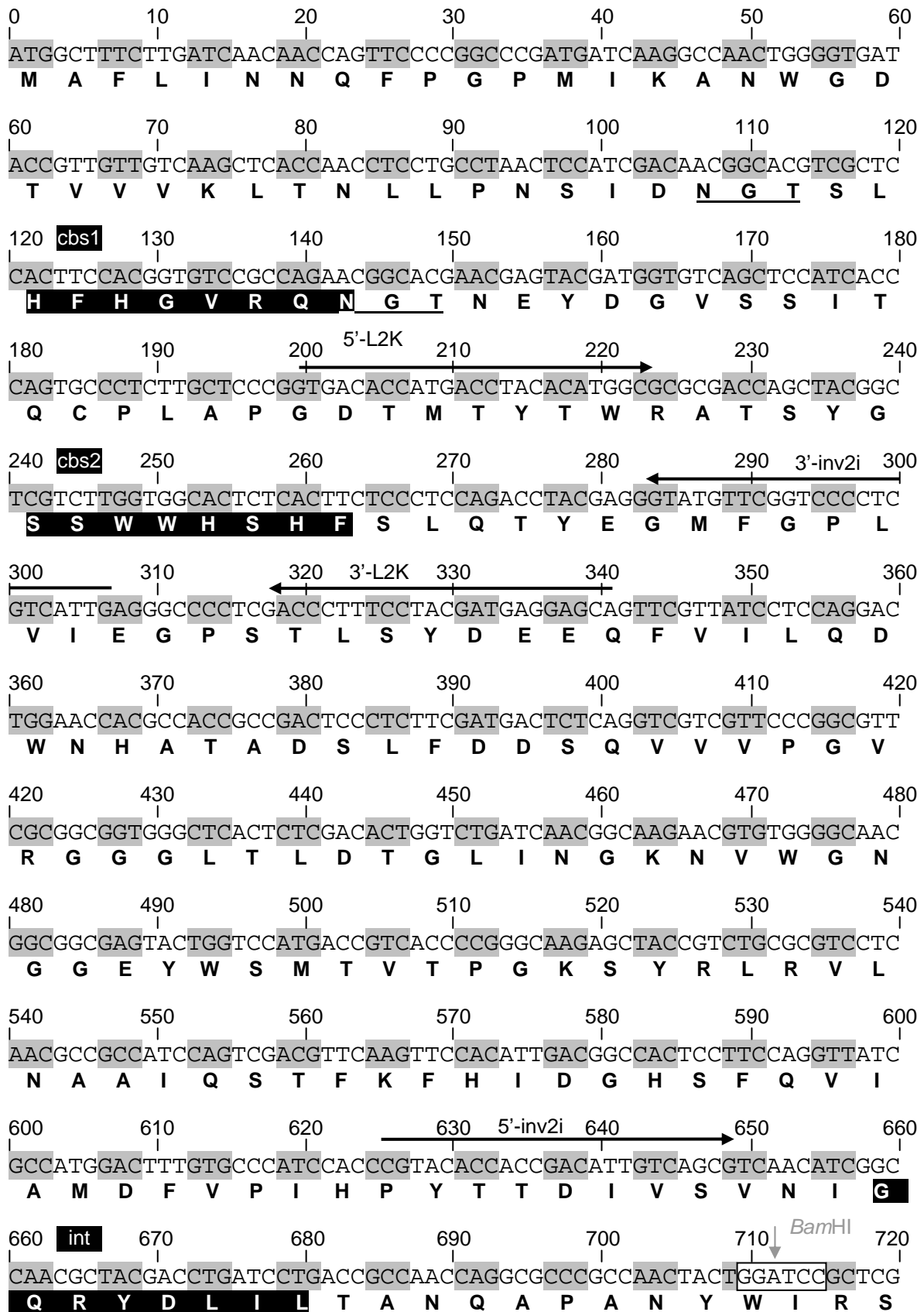
3.4.2.2 Annotierte Sequenz des Gens *lacc2*

Die DNA-Sequenz des *lacc2*-Gens wurde vollständig aufgeklärt. Das Gen umfasst 1696 bp und enthält zwei hypothetische Introns mit einer Größe von 58 und 141 bp. Da die Laccasegene vor allem an den Enden kaum konserviert sind, ist das Startcodon durch Sequenzvergleiche nur schwer zu finden. Unter Berücksichtigung von Sequenzvergleichen und aufgefundenen Promotorstrukturen wurde das Startcodon gewählt wie in Abbildung 54 gezeigt. Das aus dieser Sequenz resultierende Protein umfasst 498 Aminosäuren. Umgerechnet ergibt sich ein Molekulargewicht von 54,61 kDa. Das hypothetische Protein enthält 2 mögliche N-Glykosylierungsstellen nach dem Muster N-X-T oder N-X-S (Nita-Lazar *et al.*, 2005), wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann. Ein weiteres ATG circa 1000 bp stromaufwärts von *cbs1* kommt alternativ zu dem gewählten Startcodon als Startcodon in Betracht, da in dessen Nähe ebenfalls Promotorstrukturen, MRE-Bindestellen und eine N-terminale Signalsequenz vorliegen.

Kodierender Bereich des *lacc2*-Gens

In Abbildung 54 ist der kodierende Bereich des *lacc2*-Gens mit den hypothetischen Introns dargestellt. Die Schnittstelle für *Bam*HI, welches zur Herstellung der Matrize für die inverse PCR verwendet wurde, ist eingezeichnet. Die Sequenz stromabwärts dieser Schnittstelle wurde

über das PCR-Produkt E2i-inv erhalten. Die Primer L2K dienen zur Kontrolle eines Sequenzabschnittes. Die inversen Primer sind ebenfalls in Abbildung 54 dargestellt.



720 730 740 750 760 770 780
 GACAAC CAGCAG CCCTGCGG CAGCTC GAGCAG CCCAAC GTCCAG GCCATC CTCAACTAC
 D N Q Q P C G Q L E Q P N V Q A I L N Y

780 790 800 810 820 830 840
 GAGGGCGTCAAG TTCGCCACG CCCACC ACCACCGG CTTGAAC TACCAACCC GACTGCTTG
 E G V K F A T P T T T G L N Y Q P D C L

840 850 860 870 880 890 900
 GACGAGCCCTCGGCCAGC CTGGTGCCCTACCTCGCG CAGGACGCAGGCGCG CAGAGCGCC
 D E P S A S L V P Y L A Q D A G A Q S A

900 910 920 930 940 950 960
 GGCGAGTTTCGTCCAGACGTCCATCATCGCCGCCAACGGCGCCGTGCCCAACCTCTACAAG
 G E F V E T S I I A A N G A V P N L Y K

960 970 980 990 1000 1010 1020
 TGGACTCTCTCCGGCTCGACCTTC CAGGCCAACTGGAACGACCCCACGCTCTTCAGCATC
 W T L S G S T F Q A N W N D P T L F S I

1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TGGTACGATGGCGATGTGCCG CAGTACGGCGGCGACCTGACCGTCCGAGCTCCCCAACGCC
 W Y D G D V P Q Y G G D L T V E L P N A

1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GGCGAATGGGTCTACTTCTGTCATCGACTCGCCCATGCCCTGCCCCACCCCATCCATCTC
 G E W V Y F V I D S P M P L P **H P I H L**

1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CACGGCCACGACTTTCCTCTCTCTCGCTCCGGCGTCCGGCACCTACTCCGCGGACGTGCCT
H G H D F L L L A S G V G T Y S A D V P

1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CTCAGCTCACCAACCCGCCGCGCCGTGACGTCCGCCGTCATGCCCGCCGACCCGCTCACT
 L Q L T N P P R R D V A V M P A D P L T

1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GGCTCCGGTGGCTACCTCTGTCGTCGCCTAC CAGGTCAGCAACCCGGGTGTCTGGCTCATG
 G S G G Y L V V A Y Q V S N P G V W L M

1320 **cbs4** 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CACTGCCACATTGGCTGGGTAAAGTTTTCCCTCAAAACAAGTCCCAAGAAAACACAAAGC
H C H I G W

1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TAACATACTCCCGCAGCACAACACGATGGGCTTCGCGCTCCAGATTGTCGAGATGATCGA
H N T M G **F** A L Q I V E M I D

1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CTCGATCAAGATCGAGAATACCTGCCAGCTGCAGGAGACGTGCGTGAAC TGGCTCAACTA
 S I K I E N T C Q L Q E T C V N W L N Y

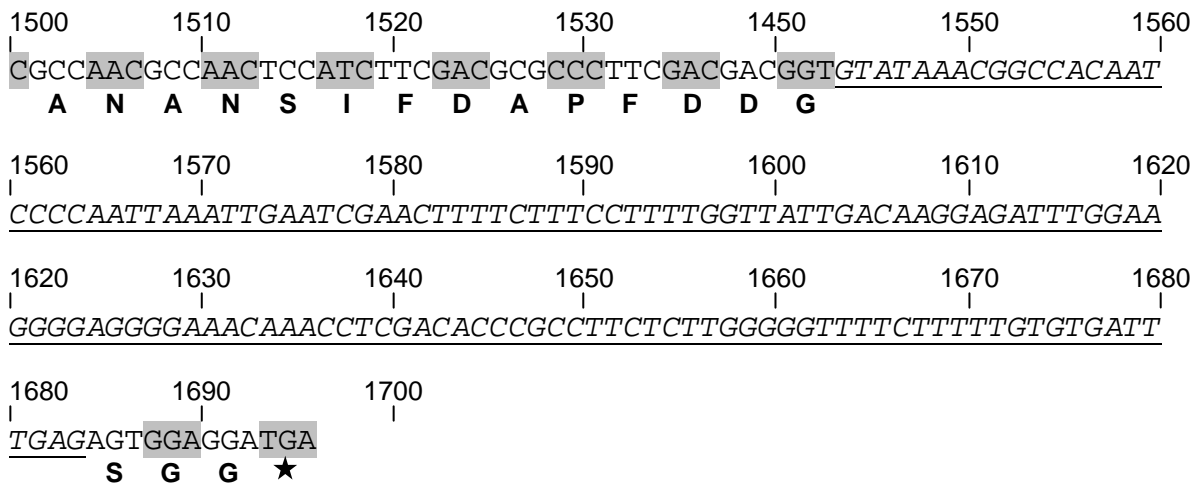


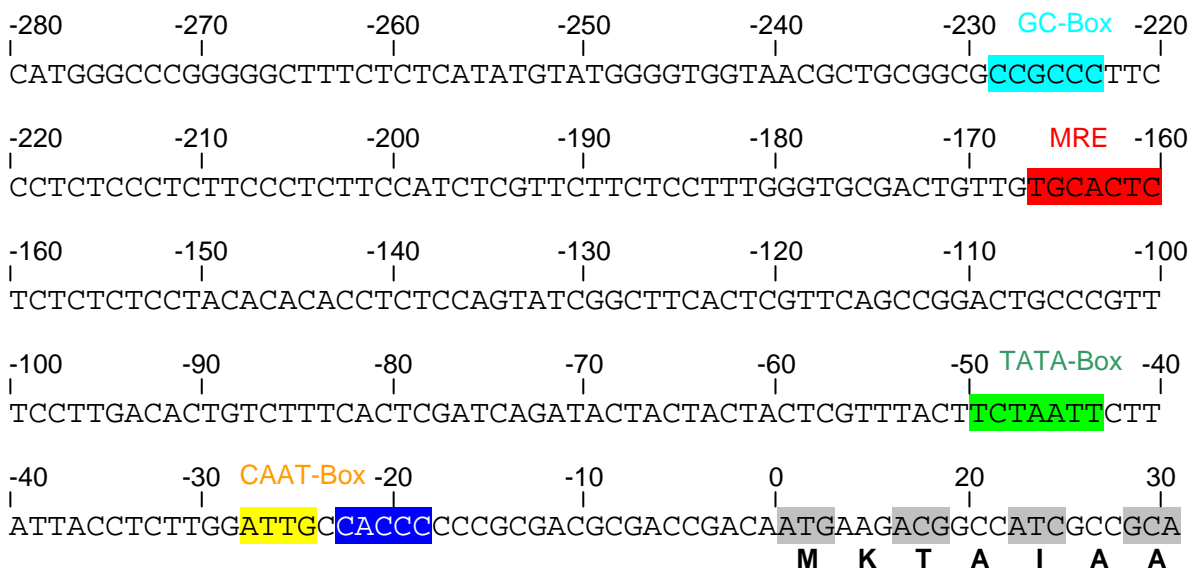
Abb. 54: Annotierte Gensequenz des Laccasegens *lacc2* (AY351909). Dargestellt ist die vollständige Sequenz des *lacc2*-Gens, das ausgehend von genomischer DNA amplifiziert worden ist. Eingezeichnet sind die cbs-Regionen und die int-Region (schwarz hinterlegt), sowie die Primer, die für die inverse PCR verwendet wurden. Die Primer L2K wurden für eine Kontroll-PCR verwendet. Durch Sequenzvergleiche wurden hypothetische Introns gefunden, welche unterstrichen dargestellt sind. Ebenso ist eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI eingezeichnet. Potenzielle N-Glykosylierungsstellen sind unterstrichen. Eingrahmt ist eine für das Redoxpotential wichtige Aminosäure.

5'- und 3'-terminale Bereiche des *lacc2*-Gens

Es wurden zwei mögliche 5'-terminale Bereiche des *lacc2*-Gens untersucht, da nicht sicher ist, welches der beiden Startcodon zu diesem Gen gehört. In Abbildung 55A ist der 5'-terminale Bereich dargestellt, der vor einem hypothetischen Startcodon liegt, welches mehr als 1000 bp vor der cbs1-Region des dazugehörigen Gens liegt. Dieses Startcodon wurde trotz seiner Entfernung zu cbs1 Erwägung gezogen, da der 5'-terminale Bereich einige Promotorelemente trägt wie ein MRE-Element, welches der Konsensussequenz nach Galhaup *et al.* (2002) entspricht, so wie eine mögliche TATA-Box, ein CACCC-Element, eine CAAT-Box und eine GC-Box. CACCC-Element und CAAT-Box kommen jedoch auf Grund ihrer Lokalisation in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstartpunkt eigentlich nicht als Regulationselemente in Betracht. Zudem konnte eine N-terminale Signalsequenz nachgewiesen werden, wenn die Sequenz, die in 3'-Richtung an dieses Startcodon anschließt, in die Proteinsequenz umgeschrieben wurde.

Zur Übersetzung des gesamten Gens in die Proteinsequenz wurde ein Startcodon gewählt, das näher an der cbs1-Region und mit dieser im Leserahmen liegt. Der 5'-terminale Bereich vor diesem Startcodon ist in Abbildung 55B gezeigt. Der Bereich enthält eine CAAT-Box, zwei GC-Boxen, die der Konsensussequenz entsprechen und zwei CACCC-Elemente, von denen die bei -170 auf Grund ihrer Lage eher als Regulationselement in Frage kommt. Ein MRE-Element war nicht nachweisbar. Ebenso sind eine hypothetische TATA-Box und ein hypothetisches Intron-Element eingezeichnet. Bei beiden 5'-terminalen Sequenzabschnitten wurde keine der Konsensussequenz entsprechende Ribosomenbindestelle gefunden.

(A)



(B)

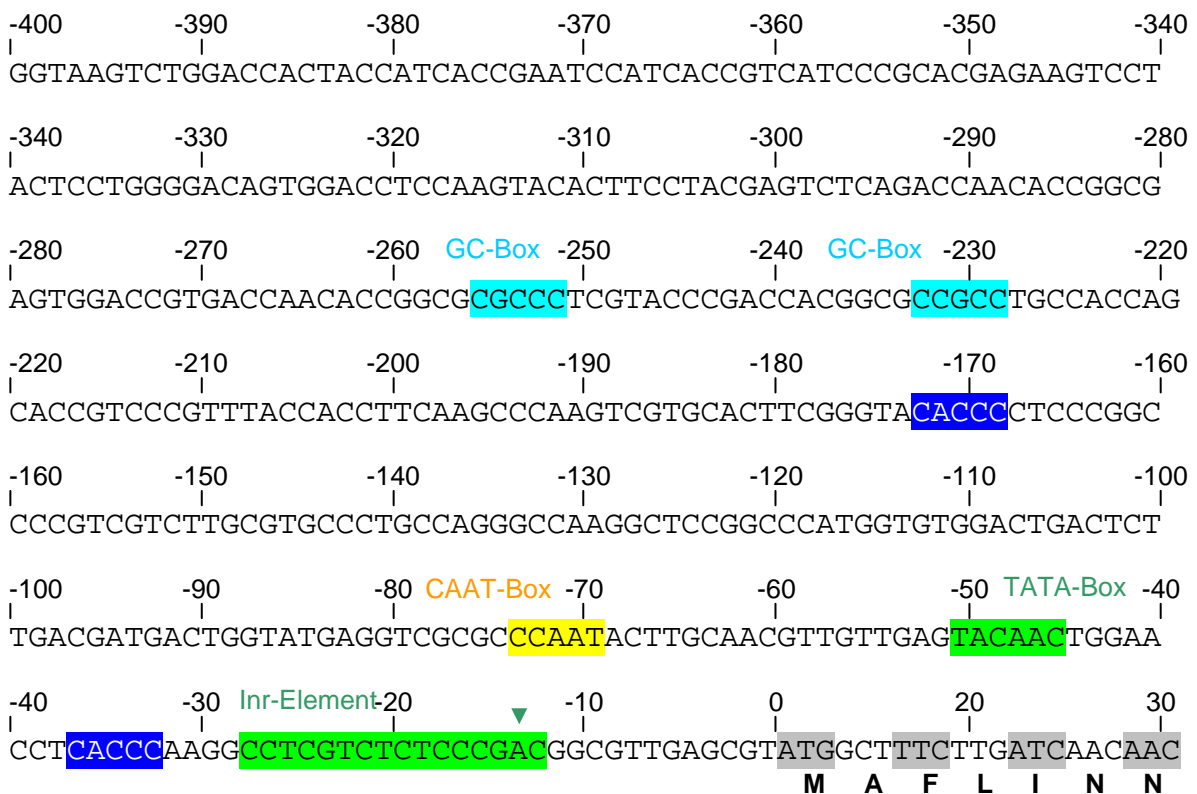


Abb. 55: 5'-terminaler Bereich des *lacc2*-Gens. (A) Mögliche Promotorelemente stromaufwärts eines hypothetischen Startcodons, das circa 1000 bp vor der *cbs1*-Region des *lacc2*-Gen liegt. (B) Mögliche Promotorelemente stromaufwärts vor dem als Startcodon festgelegten ATG, das für die Übersetzung in die Proteinsequenz verwendet wurde. Während die CAAT-Boxen eindeutig zu identifizieren waren, weichen alle gefundenen GC-Boxen und Promotorelemente von der Konsensussequenz ab. Das MRE-Element entspricht der Konsensussequenz. Der Pfeil über dem Inr-Element markiert den möglichen Transkriptionsstartpunkt.

Das bekannte 3'-terminale Ende von *lacc2* wurde in Hinsicht auf mögliche Polyadenylierungsstellen untersucht (Abb. 56). Es wurde ein Abschnitt gefunden, der der

Konsensussequenz ähnlich ist, jedoch nicht vollständig mit ihr übereinstimmt. Eine Destabilisierungssequenz gemäß der Konsensussequenz wurde gefunden und eingezeichnet.

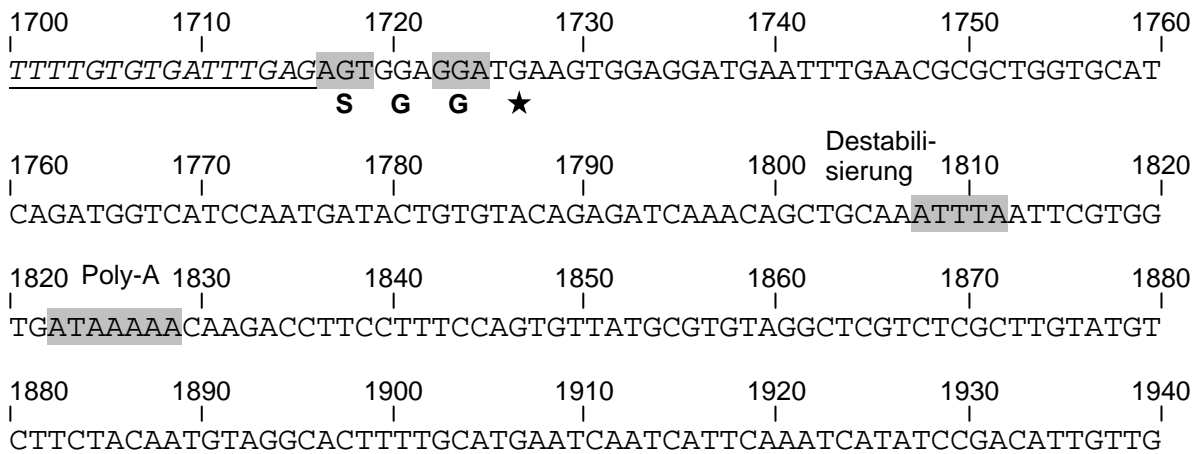
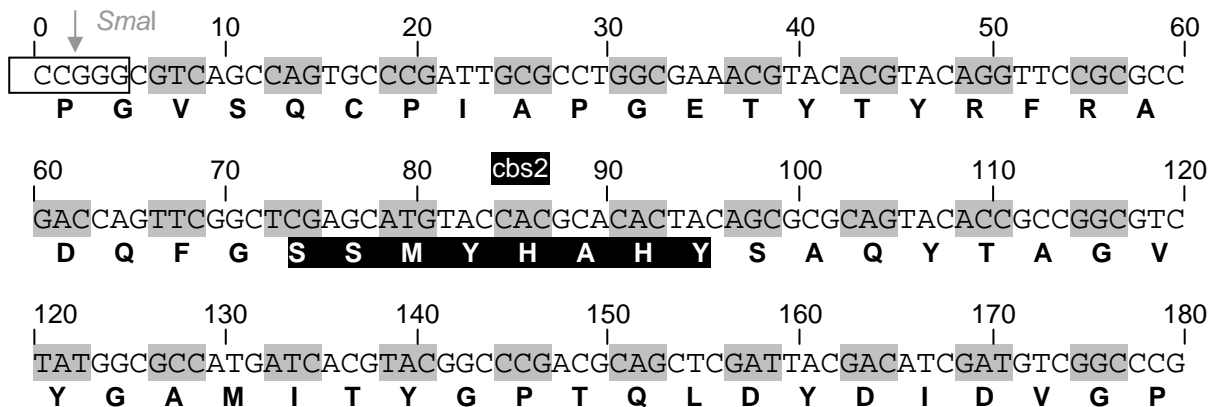


Abb. 56: 3'-terminaler Bereich des *lacc2*-Gens. Eingezeichnet sind mögliche Destabilisierungssequenzen und Polyadenylierungsstellen (Poly-A). Letzere weichen von der Konsensussequenz ab.

3.4.2.3 Annotierte Sequenz des Gens *lacc3*

Von *lacc3* ist nur eine Teilsequenz bekannt. Das bekannte Stück umfasst die Kupferbinde-regionen cbs2 und cbs3 und ist 1282 bp groß (Abb. 57). In der Darstellung wurden unvollständige Codons am 5'-Ende und am 3'-Ende weggelassen, um den Leserahmen zu wahren. Das Genfragment enthält ein hypothetisches Intron mit einer Größe von 55 bp. Das aus dieser Sequenz resultierende Teilprotein umfasst 408 Aminosäuren. Umgerechnet ergibt sich ein Molekulargewicht von 45,22 kDa. Da das 5'-Ende nicht bekannt ist, konnte der Promotorbereich nicht untersucht werden. Die Schnittstellen für *Sma*I, welches zur Herstellung der Matrize für die inverse PCR verwendet wurde, sind eingezeichnet, ebenso wie die inversen Primer. Das hypothetische Protein enthält 5 mögliche N-Glykosylierungsstellen nach dem Muster N-X-T oder N-X-S (Nita-Lazar *et al.*, 2005), wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann.



180 190 200 210 220 230 240
 GTGATCGTCAGCGACTGGAACACATCCCGTACTTCAGCATTGTGCAAAATGTCATGACG
 V I V S D W N H I P Y F S I V Q N V M T

240 250 260 270 280 290 300
 ATGAACATGTCCGAGTACCCGACGTACAGCGATAGCGGACTGATCAACGGTCGTGGACGC
 M N M S E Y P T Y S D S G L I N G R G R

300 310 320 330 340 350 360
 TTCGACTGCTCCAAGCCTTCGTATGGACAGAGCTTCAACGATTTCGAACCTGGCTTGCGAGC
 F D C S K P S Y G Q S F N D S N W L A S

360 370 380 390 400 410 420
 AACTACCCTTCCACGCTGCAATGGTCTTGCCTTGATGACGCGCAGAGGTTCGAGTTTCGC
 N Y P S T L Q W S C V D D A Q R S Q F R

420 430 440 450 460 470 480
 TTCAGAGCGGGAAGACGCATCGGCTGCGGTTGATGAATGTTGGTGCTGATGGTAAGTCA
 F Q S G K T H R L R L M N V G A D

480 490 500 510 520 530 540
 ATCTCCGAGTGCGTAACATGTTGGCGGTAATACTAACGACTCGACAGGCTTCCAAAGATT
 G F Q R F

540 550 560 570 580 590 600
 TTCCATCGATGGACACACCATGACAGTCATTGCCCTCGACTACGTTCCCGTGCAGCCATA
 S I D G H T M T V I A L D Y V P V Q P Y

600 610 620 630 640 650 660
 CACCACCGATTTCGATCATGCTCGGCATCAGCCAGCGCGCAGACGTGCTCATCACCGCCGA
 T T D S I M L G I S Q R A D V L I T A D

660 670 680 690 700 710 720
 CGCATCTCCACCTCCTTCCTTCTGGATGCGCTCCGAGCTCCTCAATGCCGCAACATGCGG
 A S S T S S F W M R S E L L N A A T C G

720 730 740 750 760 770 780
 CGGCCTTGCGCCACCCGGAATCAACGAATTCCCATCTTCGCCGAAGTCTACTACGAAGA
 G L A P P G I N E F P I F A E V Y Y E D

780 790 800 810 820 830 840
 CGCCGACACCACCCTCGAGCCCCGTGTCCACCACCACCGTCAAGAGCACCAGCTGCAACAA
 A D T T L E P V S T T T V K S T S C N N

840 850 860 870 880 890 900
 CGCGCCCATCGACATCACGCAACCGGAATACGTCATCCCGCCAGCACGCAGCCCTTCTA
 A P I D I T Q P E Y V I P P S T Q P F Y

900 910 920 930 940 950 960
 CCAAGACCTCGTCTCTACCATGACCGTCAACGATAACGGCTCCTGGGAATGGGAAATCAA
 Q D L V L T M T V N D T G S W E W E I N

3'-inv3i
 3'-inv3i-2
 5'-inv3i

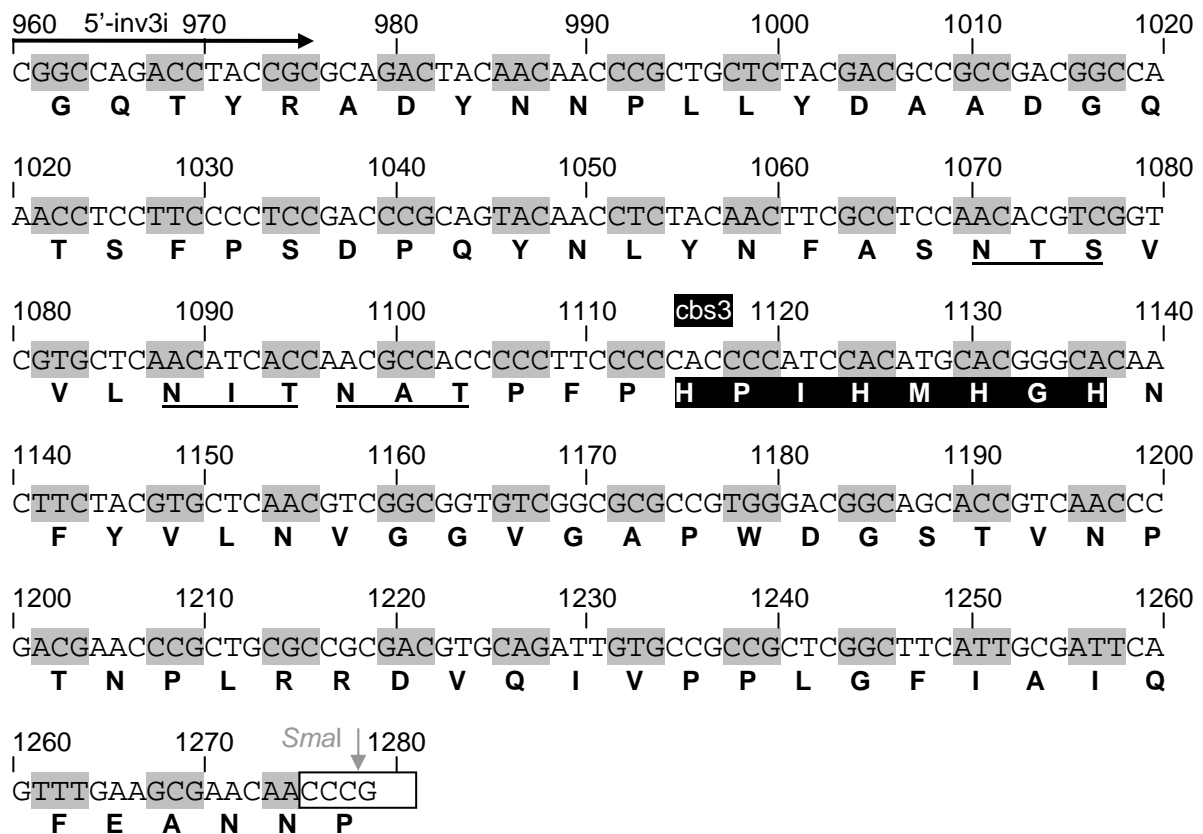


Abb. 57: Annotierte Gensequenz des Fragments des Laccasegens *lacc3* (Zugangsnummer DQ060098). Dargestellt ist der bekannte Teil des *lacc3*-Gens, der ausgehend von genomischer DNA amplifiziert worden ist. Der N-terminale und C-terminale Abschnitt des Gens sind nicht bekannt. Eingezeichnet sind die cbs-Regionen und die int-Region (schwarz hinterlegt), sowie die Primer, die für die inverse PCR verwendet wurden. An den Enden der bekannten Sequenz liegen *SmaI*-Schnittstellen. Sie begrenzen die bekannte Sequenz, weil dieses Enzym zur Herstellung der in die inverse PCR eingesetzten Restriktionsfragmente verwendet wurde. Durch Sequenzvergleiche wurde ein hypothetisches Intron gefunden, welches unterstrichen dargestellt ist. Potenzielle N-Glykosylierungsstellen sind ebenfalls unterstrichen.

3.4.2.4 Annotierte Sequenz des Gens *lacc4*

Von *lacc4* ist nur eine Teilsequenz bekannt. Das bekannte Stück umfasst die Kupferbinde-regionen cbs1 und cbs2 und ist 409 bp groß (Abb. 58). In der Darstellung wurde am 5'-Ende ein unvollständiges Codon weggelassen, um den Leserahmen zu wahren. Das Genfragment enthält kein Intron. Das aus dieser Sequenz resultierende Teilprotein umfasst 136 Aminosäuren mit einem umgerechneten Molekulargewicht von 15,03 kDa. Da das 5'-Ende nicht bekannt ist, konnte der Promotorbereich nicht untersucht werden. Die Schnittstellen für *StuI*, welches zur Herstellung der Matrize für die inverse PCR verwendet wurde, sind eingezeichnet, ebenso wie die inversen Primer. Das hypothetische Protein enthält 2 mögliche N-Glykosylierungsstellen nach dem Muster N-X-T oder N-X-S (Nita-Lazar *et al.*, 2005), wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann.

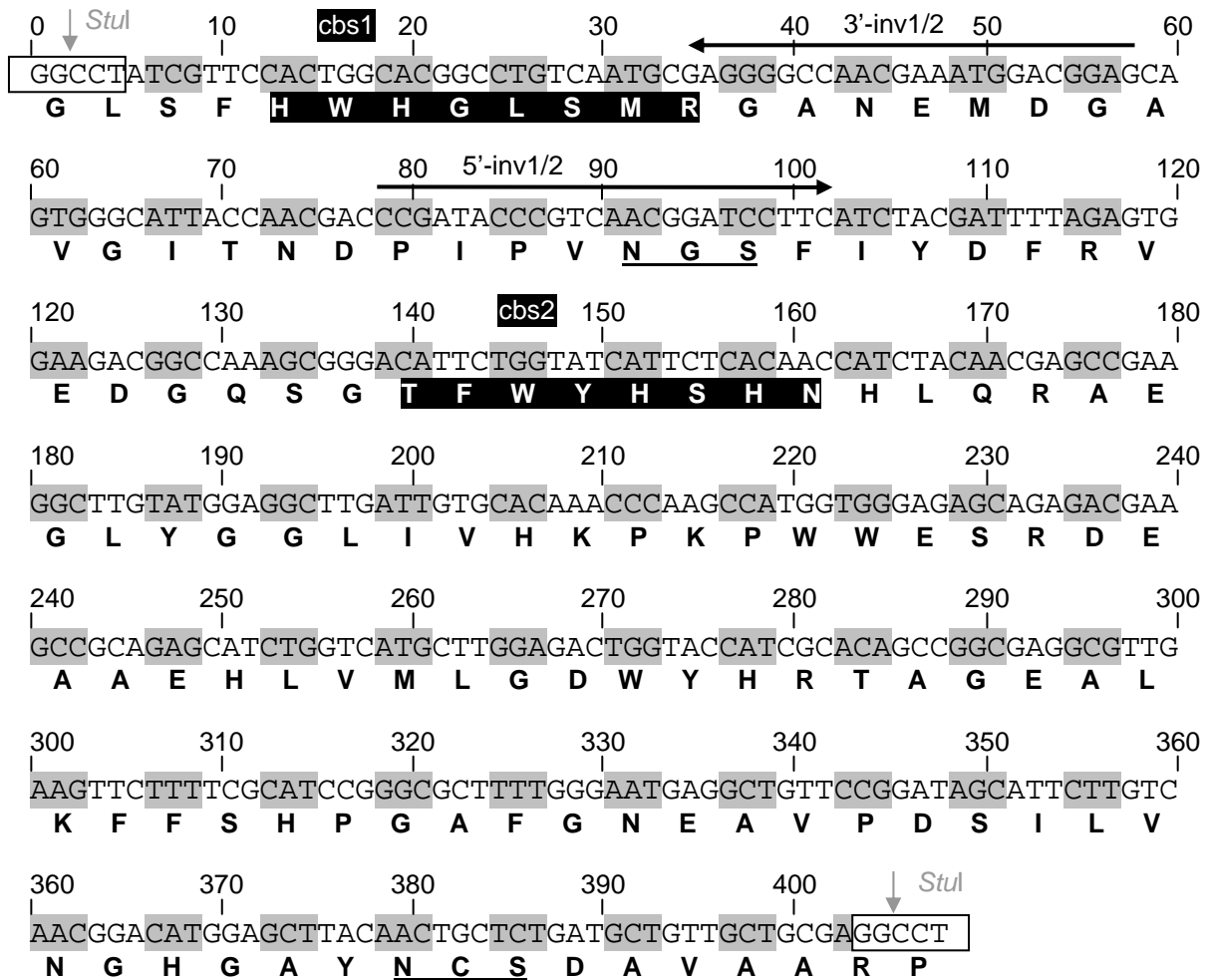


Abb. 58: Annotierte Gensequenz des Fragments des Laccasegens *lacc4* (DQ060098). Dargestellt ist der bekannte Teil des *lacc4*-Gens, der ausgehend von genomischer DNA amplifiziert worden ist. Der N-terminale und C-terminale Abschnitt des Gens sind nicht bekannt. Eingezeichnet sind die cbs-Regionen (schwarz hinterlegt), sowie die Primer, die für die inverse PCR verwendet wurden. An den Enden der bekannten Sequenz liegen *Stu*I-Schnittstellen. Sie begrenzen die bekannte Sequenz, weil dieses Enzym zur Herstellung der in die inverse PCR eingesetzten Restriktionsfragmente verwendet wurde. Potenzielle N-Glykosylierungsstellen sind unterstrichen.

3.4.3 Eigenschaften der Laccasesequenzen

Bei der Auswertung auf Aminosäureebene muss bedacht werden, dass die Proteinsequenz nur indirekt, d. h. über eine computergestützte Umschreibung der DNA-Sequenz ermittelt wurde. Aus diesem Grund müssen die von den Laccasegenen *lacc1-4* kodierten Genprodukte, die mit Lacc1-4 bezeichnet werden, als hypothetisch aufgefasst werden. Ob es sich bei diesen Genprodukten wie postuliert um die Laccasen I-IV handelt, ist zurzeit noch unklar.

Mit Hilfe von Computerprogrammen lässt sich die Hydrophobizität und die Aminosäurezusammensetzung dieser hypothetischen Laccasen bestimmen. Auch eine N-terminale Signalsequenz zum Export der Proteine kann aufgespürt werden. Bei der Analyse von Lacc4 ist zu beachten, dass diese Sequenz nur ein kurzes Stück des eigentlichen Proteins umfasst und deshalb die Ergebnisse nicht für das gesamte Protein repräsentativ sein müssen.

3.4.3.1 Anwesenheit von Signalsequenzen für den Proteinexport

Die von den vollständig bekannten Genen *lacc1* und *lacc2* kodierten Proteine Lacc1 und Lacc2 wurden mit Hilfe des Computerprogramms SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004) daraufhin untersucht, ob sie eine N-terminale Signalsequenz für den Export des Proteins aufweisen. Für Lacc1 wurde eine Signalsequenz gefunden (Abb. 59A). Für Lacc2 wurden verschiedene Startcodons untersucht. Eine Signalsequenz wurde nur hinter einem Startcodon gefunden, welches mehr als 1000 bp stromaufwärts von *cbs1* liegt (Abb. 59C, vergleiche auch Abb. 55). In unmittelbarer Nähe zu dem zum Umschreiben der DNA-Sequenz genutzten Startcodon war keine Signalsequenz nachweisbar (Abb. 59B).

Da es auch interne Signalsequenzen gibt (Stryer, 1995), die mit diesem Programm nicht erfasst werden können, wurde mit dem Computerprogramm SecretomeP die Wahrscheinlichkeit dafür ermittelt, dass Lacc2 trotz fehlender N-terminaler Signalsequenz ein extrazelluläres Protein ist. Bei einem Wert größer als 0,6 ist davon auszugehen, dass das untersuchte Protein sezerniert wird, auch wenn es keine N-terminale Signalsequenz aufweist. Für Lacc2 lag dieser Wert bei 0,842. Von Lacc3 und Lacc4 ist der N-terminale Teil nicht bekannt und konnte deshalb nicht untersucht werden. Zur Kontrolle durchgeführte Analysen mit SignalP lieferten keine Signalsequenzen in den Fragmenten (nicht gezeigt). Die von SecretomeP gelieferten Werte lagen bei 0,762 und 0,723 für Lacc3 und Lacc4. Die dargestellten Diagramme (Abb. 59) wurden mit dem NN-Model (neural network) erstellt. Der C-Score zeigt die Wahrscheinlichkeit einer Schnittstelle (Cleavage Site) an, der S-Score die Wahrscheinlichkeit einer Signalsequenz und der Y-Score ergibt sich aus einer Kombination der beiden Werte. Die angegebenen Werte für die Signalpeptidwahrscheinlichkeit und Spaltungsstellenwahrscheinlichkeit wurden über das HM-Model (hidden Markov) errechnet.

Zusätzlich wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Psort die wahrscheinliche Lokalisation der Proteine Lacc1 und Lacc2 ermittelt, wobei dieses Programm vor allem die Anwesenheit verschiedener Signalsequenzen überprüft. Für Lacc1 ergab sich, wie die Anwesenheit der N-terminalen Signalsequenz erwarten ließ, eine 77,8 %ige Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im extrazellulären Raum einschließlich der Zellwand. Als weitere Möglichkeit wurde mit 22,2 % die Vakuole angegeben. Lacc2 dagegen ist mit 69,6 %iger Wahrscheinlichkeit im Cytoplasma lokalisiert. Zusätzlich angegeben sind mit 17,4 % der Zellkern und mit je 4,3 % die Vakuole, die Mitochondrien und die Vesikel des sekretorischen Systems, wobei zumindest der Zellkern und die Mitochondrien nach heutigem Stand der Forschung als Kompartiment für Laccasen ausgeschlossen werden können.

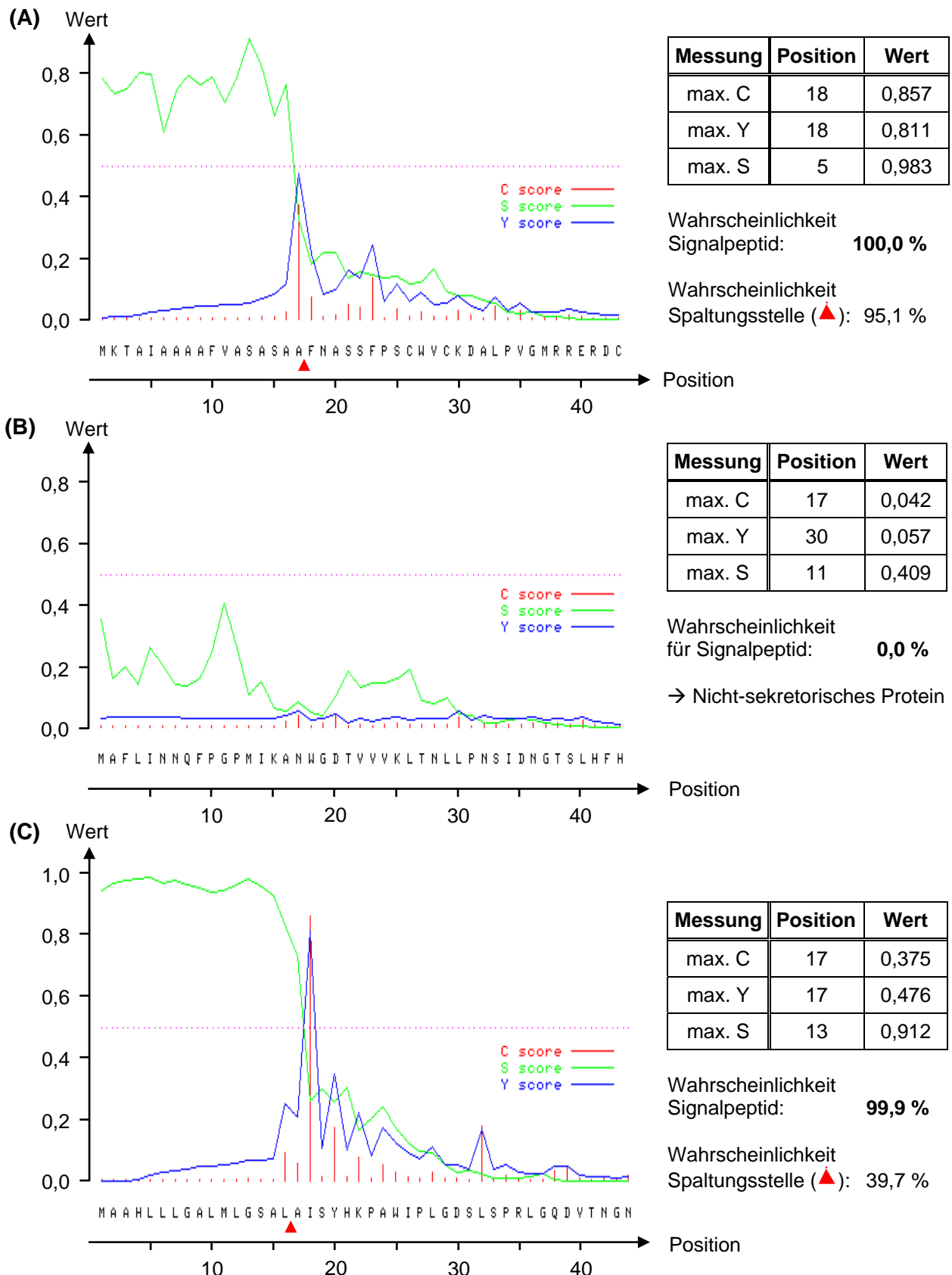


Abb. 59: Mögliche N-terminale Signalsequenzen von Lacc1 (A) und Lacc2 (B, C). Die Sequenzen, die das fertige Genprodukt für den Export markieren, wurden mit Hilfe des Programms SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004) aufgefunden. Angegeben sind die Wahrscheinlichkeiten für Signalpeptid und Spaltungsstelle. Die wahrscheinlichste Spaltungsstelle ist markiert (▲). Für Lacc2 sind zwei mögliche N-Termini untersucht worden, von denen in (B) dasjenige dargestellt ist, welches näher an *cbs1* liegt (siehe auch Abb. 55).

3.4.3.2 Hydrophobizitätsprofile

Der Kyte-Doolittle-Plot dient zur Analyse der Hydrophobizitätsverteilung eines Proteins. Die gewählte Fenstergröße von 21 Aminosäuren (Anzahl von Aminosäuren, über die gemittelt wird) ist geeignet, um hydrophobe Membrandomänen ausfindig zu machen. Diese haben einen Hydrophobizitätsindex von über 1,6 und sind somit bei allen vier untersuchten Sequenzen nicht vorhanden (Abb. 60). Deutlich zu erkennen ist dagegen die N-terminale Signalsequenz von Lacc1, die eine sehr hohe Hydrophobizität aufweist (Abb. 60A). Lacc2 weist keine hydrophobe Signalsequenz auf, doch liegt eine Signalsequenz weiter stromaufwärts (siehe 3.4.3.1), welche in Abbildung 60C zusätzlich gezeigt wird (kleines Bild).

Vergleicht man alle vier Hydrophobizitätsprofile und berücksichtigt, welche Teilsequenzen von Lacc3 und Lacc4 bekannt sind, so lässt sich feststellen, dass alle Profile einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Sie besitzen drei besonders hydrophile Bereiche, die am Anfang, in der Mitte und kurz vor dem Ende der Proteinsequenz liegen. Bei Lacc1 handelt es sich um die Bereiche um Position 60, 220 und 500, bei Lacc2 liegen diese um 50-80, 230 und 400, bei Lacc3 um die Bereiche 100-150 (entspricht dem mittleren Bereich) und 300 und bei Lacc4 um den Bereich 50-100 (vorderer Bereich). Der C-Terminus von Lacc1 und Lacc2 ist dagegen deutlich hydrophob. Bei Lacc3 und Lacc4 konnte dieser Teil nicht untersucht werden, da der entsprechende Sequenzabschnitt noch unbekannt ist. Von verfügbaren Sequenzen anderer Laccasen wurden ebenfalls Hydrophobizitätsprofile erstellt und mit denen der *H. acidophila*-Laccasen verglichen (nicht gezeigt). Hierbei zeigte sich, dass die untersuchten Laccasen kein einheitliches Profil aufwiesen und sich somit alle in ihrer Hydrophobizitätsverteilung von den Laccasen von *H. acidophila* unterschieden. Vor allem der hydrophobe Bereich am C-Terminus fehlte.

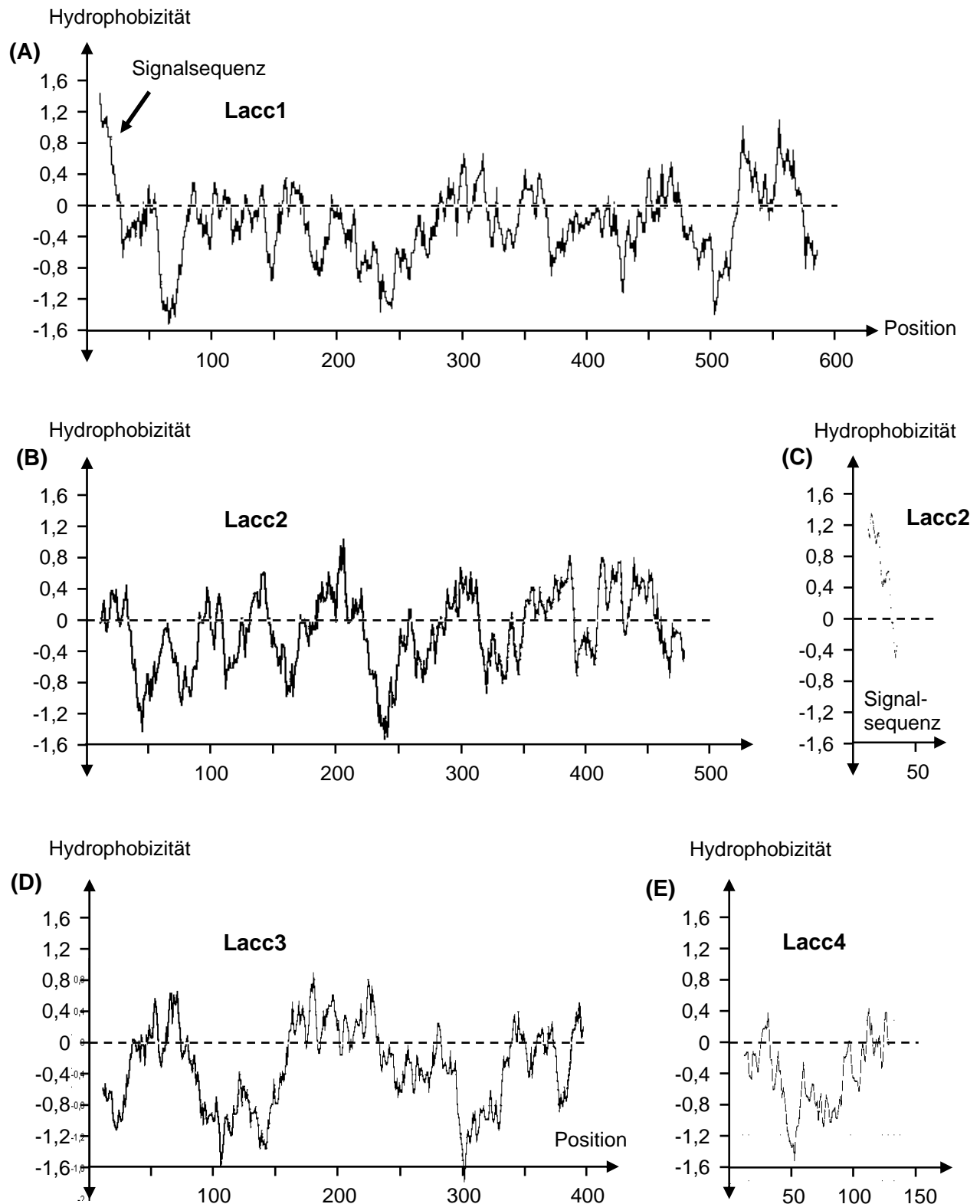


Abb. 60: Hydrophobizitätsprofile der hypothetischen Laccasen von *H. acidophila*. Die Profile wurden im Computerprogramm BioEdit nach dem Kyte-Doolittle-Algorithmus (1982) berechnet. Dabei wird jeder Aminosäure ein Hydrophobizitätsindex zugeordnet. Je positiver der Wert, desto hydrophober ist die Aminosäure. Zur Erstellung der Grafik wurden die Werte über 21 Aminosäuren gemittelt (Fenstergröße = 21 Aminosäuren). Für Lacc2 ist zusätzlich ein alternativer N-Terminus mit Signalsequenz dargestellt, von dem nicht bekannt ist, ob er zu Lacc2 gehört (vergleiche Abb. 55).

3.4.3.3 Aminosäurezusammensetzung und Anpassung an saure Umweltbedingungen

Die Aminosäurezusammensetzung von Lacc1, Lacc2, Lacc3 und Lacc4 wurde bestimmt. Anschließend wurden die sauren (Asp, Glu) und die basischen Aminosäuren (His, Lys, Arg), die Aminderivate (Asn, Gln), die aromatischen (Phe, Trp, Tyr), die kleinen aliphatischen (Ala, Gly, Pro), die großen aliphatischen (Ile, Leu, Val), die aliphatischen und Hydroxylgruppen tragenden (Ser, Thr) und die aliphatischen und Schwefelgruppen tragenden Aminosäuren (Cys, Met) zusammengefasst und ihr Anteil an der Proteinzusammensetzung in einem Kreisdiagramm dargestellt (Abb. 61).

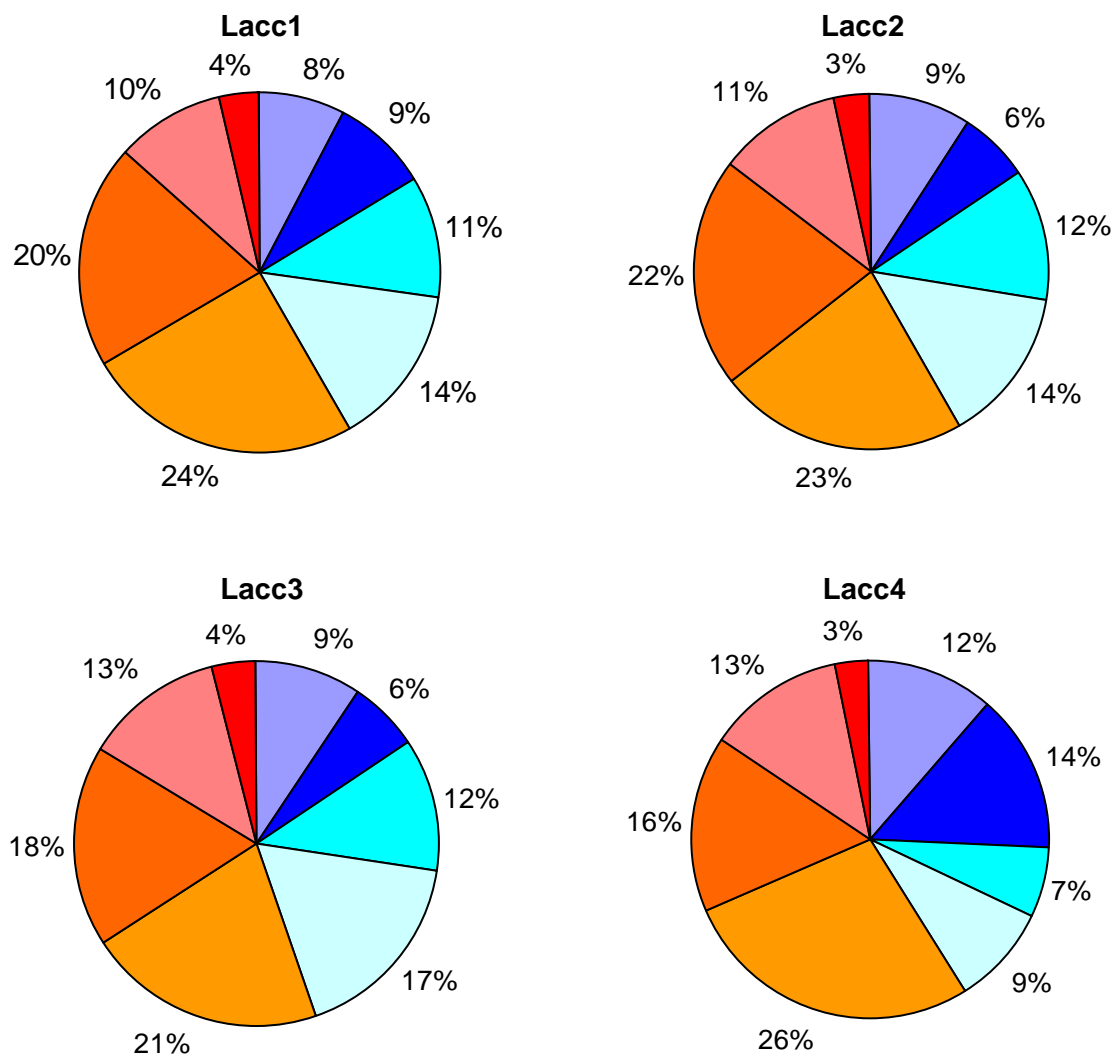
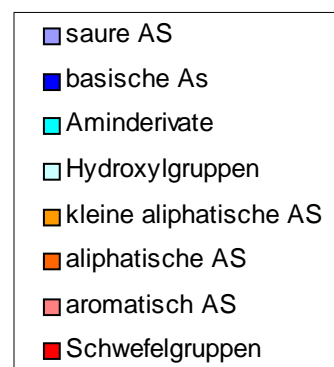


Abb. 61: Aminosäurezusammensetzung von Lacc1, Lacc2, Lacc3 und Lacc4. Die Aminosäuren sind in Gruppen nach ihren Eigenschaften zusammengefasst. Hydrophobe Aminosäuren sind rot dargestellt, hydrophile blau.



Lacc1, Lacc2 und Lacc3 weisen eine sehr ähnliche Aminosäurezusammensetzung auf, wobei der Anteil der hydrophoben Aminosäuren etwas höher ist als der der hydrophilen Aminosäuren. Innerhalb der hydrophoben Aminosäuren nehmen die kleinen, aliphatischen Aminosäuren den größten Anteil ein, innerhalb der hydrophilen Aminosäuren stellen die Aminosäuren mit Hydroxylgruppen die größte Fraktion. Basische und saure Aminosäuren sind mit höchstens 3 % Unterschied fast gleich häufig vertreten. Das Fragment von Lacc4 weist im Wesentlichen die gleiche Aminosäurezusammensetzung auf wie die anderen Laccasen von *H. acidophila*, nur ist der Anteil an hydrophoben Aminosäuren insgesamt höher. Auch der Anteil der geladenen Aminosäuren ist deutlich höher als bei den anderen Laccasen, wobei das Verhältnis von basischen und sauren Aminosäuren ähnlich ist.

Zudem wurden die Laccasen von verschiedenen anderen Organismen auf die gleiche Art untersucht. Da acidophile Proteine tendenziell mehr hydrophobe und weniger geladene Aminosäuren aufweisen sollen (Yang & Haug, 1979; Schwermann *et al.*, 1994), wurde für jede untersuchte Laccase der Anteil an hydrophoben und geladenen Aminosäuren ermittelt und in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 62). Aus diesen Werten wurden außerdem Mittelwerte berechnet, um sie mit den Werten der *H. acidophila*-Laccasen vergleichen zu können. Es zeigte sich, dass der Anteil an hydrophoben Aminosäuren bei den Laccasen von *H. acidophila* ähnlich hoch ist wie bei den anderen untersuchten, nicht an saure Bedingungen angepassten Laccasen (Tab. 19). Der Anteil an geladenen Aminosäuren ist dagegen – von Lacc4 abgesehen – deutlich niedriger als bei diesen Laccasen. Die Mittelwerte der hydrophoben Aminosäuren der nicht-acidophilen Laccasen liegen bei 55,8 %, die der geladenen Aminosäuren bei 19,2 %. Die Proteine Lacc1, 2 und 4 bestehen zu circa 58 % aus hydrophoben Aminosäuren. Bei Lacc3 liegt der Anteil mit circa 55 % hydrophoben Aminosäuren etwas niedriger (Tab. 19). Die Proteine Lacc1-3 weisen zwischen 15,5 % und 16,5 % geladene Aminosäuren auf, das Fragment von Lacc4 dagegen fast 26 %. Für Lacc1-3 ist die Anzahl an geladenen Aminosäuren somit zwischen 14 % und 18 % niedriger als beim Durchschnitt der untersuchten Laccasen (Abb. 62). Insgesamt sind jedoch die Schwankungen zwischen den Werten der einzelnen nicht-acidophilen Laccasen sehr groß (Abb. 62). Der bekannte Teil von Lacc4 ist für eine repräsentative Auswertung der Aminosäurezusammensetzung sicherlich zu kurz.

Da nach Eckert & Schneider (2003) vor allem der Anteil der positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin bei acidophilen Proteinen verringert sein soll, wurden diese noch einmal gesondert untersucht (Tab. 19). Der Lysingehalt liegt für alle Laccasen aus *H. acidophila* deutlich unter dem Mittelwert der nicht-acidophilen Laccasen von 2,9 %, während der

Arginingehalt nur für Lacc1 und Lacc2 niedriger liegt als der Mittelwert von 3,4 %. Besonders deutlich ist dieser Unterschied bei Lacc2. Der Arginingehalt von Lacc3 ist fast gleich dem Mittelwert, der von Lacc4 ist sogar höher, wobei hier wieder zum Tragen kommt, dass es sich nur um Teilsequenzen handelt.

Tab. 19: Anteil hydrophober und geladener Aminosäuren (AS) an den Sequenzen von Lacc1-4. Angegeben ist der Anteil der Aminosäuren an der Gesamtsequenz und die Reduktion der geladenen Aminosäuren in Relation zum Mittelwert (nicht-acidophile Laccasen). Werte in Klammern beziehen sich auf das hypothetische Lacc1-Protein nach Abspaltung der Signalsequenz (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

	Lacc1	Lacc2	Lacc3	Lacc4	Mittelwert nicht-acidophil
Anteil hydrophober AS	58,3 % (57,4 %)	58,4 %	55,4 %	58,9 %	55,8 %
Anteil geladener AS	16,5 % (16,8 %)	15,9 %	15,7 %	25,7 %	19,2 %
Reduktion (geladene AS)	14,1 % (12,5 %)	17,2 %	18,2 %	keine	
Lysingehalt	2,2 % (2,3 %)	1,6 %	0,7 %	2,2 %	2,9 %
Reduktion (Lysingehalt)	23,7 % (21,6 %)	43,9 %	74,2 %	23,0 %	
Arginingehalt	3,2 % (3,3 %)	1,8 %	3,4 %	4,4 %	3,4 %
Reduktion (Arginingehalt)	7,0 % (4,4 %)	47,4 %	keine	keine	

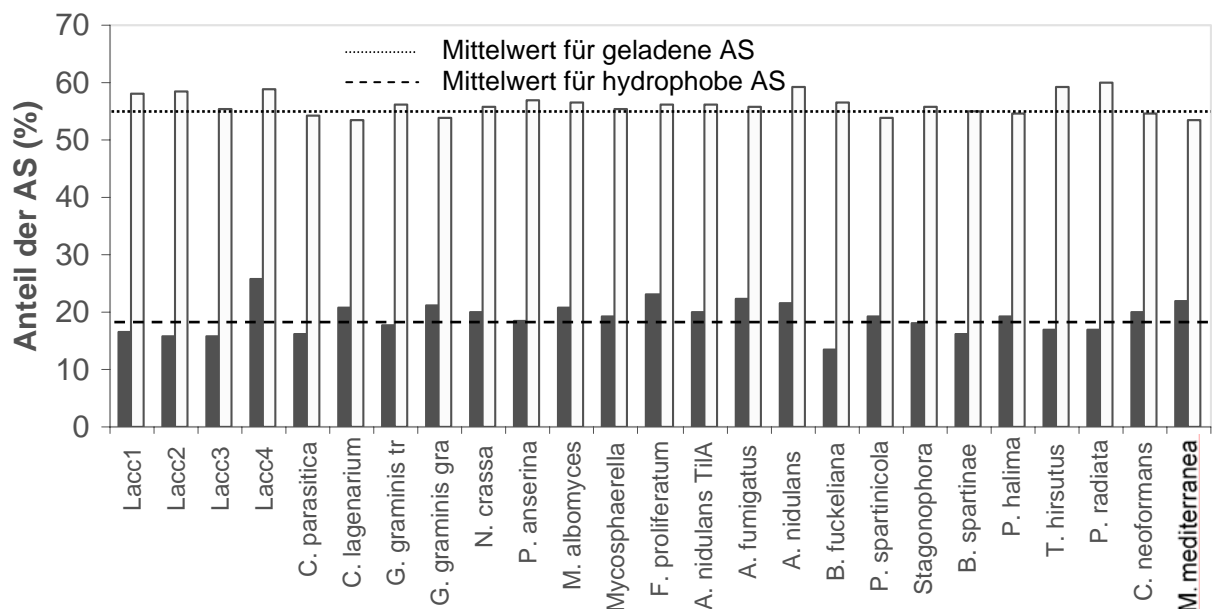


Abb. 62: Anteile der hydrophoben (grau) und der geladenen Aminosäuren (schwarz) an der Proteinsequenz von Laccasen aus verschiedenen Pilzen. Untersucht wurden neben den Laccasen aus *H. acidophila* Laccasen aus folgenden Organismen: Ascomycetische Pilze – *Cryphonectria parasitica* (Q03966), *Colletotrichum lagenarium* (Q9C497), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Q8TFE2) und var. *graminis* (Q8TFE1), *Neurospora crassa* (P06811), *Podospora anserina* (P78722), *Melanocarpus albomyces* (Q70KY3), *Mycosphaerella* spec. (Q8J240), *Fusarium proliferatum* (AAK72900), *Aspergillus nidulans* (tilA, CAC59820), *A. fumigatus* (AAF03349), *A. nidulans* (CAA36787) *Botrytis*

fuckeliana (AAK77952), *Phaeosphaeria spartinicola* (Q8J251), *Buergenerula spartinae* (Q8J239), *Stagonophora* spec. (Q8J247) und *Phaeosphaeria halima* (AAN17300). Basidiomycetische Pilze – *Trametes hirsutus* (A35883), *Phlebia radiata* (CAA36379), *Cryptococcus neoformans* (A36962). Bakterien – *Marinomonas mediterranea* (AAF75831). Die Sequenzen der Laccasen aus folgenden Organismen sind nicht vollständig: *M. albomyces*, *F. proliferatum*, *P. spartinicola*, *P. halima*, *Stagonophora* spec., *Mycosphaerella* spec. und *B. spartinae*.

3.4.3.4 Redoxpotenzial

Das genaue Redoxpotential muss experimentell bestimmt werden, doch an Hand der Proteinsequenz der hypothetischen Laccasen lässt sich das Potenzial zumindest abschätzen. Interessant ist dafür eine Aminosäure, die in der Nähe des Typ 1-Kupfers liegt und dadurch das Redoxpotenzial beeinflusst. Diese Aminosäure kann bei Laccasen ein Methionin (M), Leucin (L) oder Phenylalanin (F) sein und liegt in der Primärstruktur des Proteins fünf Aminosäuren hinter dem letzten Histidin (H) von *cbs4*, welches für die Bindung des Typ1-Kupfers benötigt wird (Abb. 69). Laccasen lassen sich in die Klassen 1 (M), 2 (L) und 3 (F) einordnen, wobei das Redoxpotenzial von Klasse 1 zu Klasse 3 ansteigt (Hatamoto *et al.*, 1999). Lacc1 trägt an der entsprechenden Stelle ein Leucin und kann damit der Klasse 2 zugeordnet werden, Lacc2 trägt ein Phenylalanin und gehört zur Klasse 3 (Abb. 51 und 54). Von Lacc3 und Lacc4 ist der entsprechende Teil der Sequenz nicht bekannt.

3.4.4 Sequenzvergleiche und Homologien der hypothetischen Laccasen

Die Sequenzen der vier Laccasen von *H. acidophila* wurden untereinander verglichen, wobei jeweils nur die Bereiche berücksichtigt wurden, in denen sich die Sequenzen überschneiden (Tab. 20). Nur Lacc1 und Lacc2 konnten über die gesamte Länge verglichen werden. Die Homologien der Proteine untereinander sind mit Identitätswerten zwischen 23 % und 44 % sehr niedrig. Selbst wenn die chemischen Ähnlichkeiten der Aminosäuren berücksichtigt werden, liegen die Werte höchstens bei 62 %. Die größte Homologie bestand zwischen Lacc1 und Lacc3, die niedrigste zwischen Lacc1 und Lacc4.

Laccasen	Identität (%)	Ähnlichkeit (%)
Lacc1 / Lacc2	27	46
Lacc1 / Lacc3	44	62
Lacc1 / Lacc4	23	40
Lacc2 / Lacc3	29	53
Lacc2 / Lacc4	26	43
Lacc3 / Lacc4	26	44

Tab. 20: Homologien der Laccasen von *H. acidophila* untereinander. Verglichen wurden nur die Abschnitte, in denen sich die Sequenzen überschneiden, um die Homologiewerte nicht zu verfälschen (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Beim Vergleich der Laccasen mit einer Proteindatenbank wurden als homologe Proteine ausschließlich Laccasen und hypothetische, in ihrer Funktion noch nicht charakterisierte Proteine angezeigt (Tab. 21). Einzige Ausnahmen waren zwei kupferhaltigen Proteine, die Dihydrogeodinoxidase von *Aspergillus terreus* und das Fet3-Protein von *Saccharomyces cerevisiae* auf. In Tabelle 20 sind die Organismen aufgelistet, deren Laccasen die höchsten Homologien zu den Laccasen von *H. acidophila* aufwiesen. Diese wurden aus den ersten 100 Treffern der Homologiesuche ausgewählt, wobei hypothetische Proteine und Mehrfachnennungen (Laccasen aus verschiedenen Stämmen oder verschiedenen Laccasen aus einem Stamm) für die Erstellung der Tabelle nicht berücksichtigt wurden. Besonders hohe Homologien zu den Laccasen aus *H. acidophila* wies zudem ein hypothetisches Protein aus *Magnaporthe grisea* auf, einem pflanzenpathogenen Ascomyceten.

Die höchsten Homologien zu Laccasen aus anderen Pilzen lagen bei 48 % (Lacc1), 46 % (Lacc2), 40 % (Lacc3) und 44 % (Lacc4) Identität. Die Pilze, deren Laccasen die höchsten Homologien zu Lacc1-3 aufwiesen, waren überwiegend Ascomyceten. Für alle drei Proteine handelt es sich dabei um die Pilze *F. proliferatum*, *B. fuckeliana*, *G. graminis*, *C. parasitica*, *C. lagenarium*, *P. anserina*, *N. crassa* und *M. albomyces*. Die Laccasen aus Basidiomyceten mit den höchsten Homologien waren zu 34 % (*R. microporus*/Lacc1), 32 % (*P. ostreatus*/Lacc2) und 31 % (*C. cinereus*/Lacc3) identisch mit Lacc1-3. Lacc1 und Lacc3 sind sich im Hinblick auf die Homologien zu Laccasen aus anderen Pilzen am ähnlichsten. Im Gegensatz dazu stammten fast alle Laccasen mit hohen Homologien zu Lacc4 aus Basidiomyceten. Einzige Ausnahme war eine Laccase aus *F. proliferatum*.

Tab. 21: Homologien von Lacc1, Lacc2, Lacc3 und Lacc4 zu bekannten Laccasen aus anderen Pilzen. Die Pilze mit den Laccasen, die die höchsten Homologien zu den Laccasen aus *H. acidophila* aufweisen, sind aufgeführt. Angegeben ist der jeweilige Anteil der identischen (erste Zahl) und der ähnlichen Aminosäuren (zweite Zahl) im Vergleich zu den Laccasen aus *H. acidophila*. (B) kennzeichnet die Basidiomyceten. Die Zugangsnummern sind: AAK72901^{1,3}/AAG23875²/AAK72903⁴ (*F. proliferatum*), AAK77953^{1,3}/AAK77952² (*B. fuckeliana*), CAD24841^{1,3}/CAD24842² (*G. graminis*), AAA33592¹/XP_323881²/LAC2_NEUCR³ (*N. crassa*), BAB32575 (*C. lagenarium*), LAC1_CRYPA (*C. parasitica*), LAC2_PODAN (*P. anserina*), CAE00180 (*M. albomyces*), LAC1_BOTCI (*B. cinerea*), AAS21662 (*P. chrysogenum*), AAQ82021¹/AAO38869³ (*R. microporus*), XP_571804¹/AAW44497⁴ (*C. neoformans*), LAC1_PHLRA¹/S18746³ (*P. radiata*), AAW47924 (*G. cingulata*), AAR82933 (*A. auricula*), CAA06292²/CAC69853⁴ (*P. ostreatus*), AAD30965 (*C. cinereus*), AAF13052 (*P. cinerarius*), BAA31217 (*S. commune*), AAT99291 (*L. edodes*), CAD45379 (*P. sajor-caju*), AAM18408 (*T. pubescens*), Q12717 (*T. versicolor*), AAB47735 (*T. villosa*), AAC89554 (*T. hirsutus*), AAR21096 (*F. velutipes*), AAG09231 (*P. ciliata*), AAR01248 (*C. cinerea*). *B. cinerea* und *B. fuckeliana* sind ein anamorph/teleomorph-Paar. Die hochgestellten Zahlen hinter den Zugangsnummern verweisen auf Lacc1-4 (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Lacc1			Lacc2		
	Organismus	Homologie		Organismus	Homologie
1	<i>Fusarium proliferatum</i>	48 % / 63 %		<i>Botrytinia fuckeliana</i>	46 % / 60 %
2	<i>Botrytinia fuckeliana</i>	38 % / 53 %		<i>Gaeumannomyces graminis</i>	42 % / 60 %
3	<i>Cryphonectria parasitica</i>	38 % / 52 %		<i>Botrytis cinerea</i>	42 % / 55 %
4	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	37 % / 52 %		<i>Glomerella cingulata</i>	38 % / 58 %
5	<i>Neurospora crassa</i>	35 % / 52 %		<i>Fusarium proliferatum</i>	38 % / 52 %
6	<i>Colletotrichum lagenarium</i> <i>Podospora anserina</i>	35 % / 51 %		<i>Colletotrichum lagenarium</i>	37 % / 54 %
7	<i>Melanocarpus albomyces</i>	35 % / 50 %		<i>Cryphonectria parasitica</i>	36 % / 53 %
8	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Rigidoporus microporus</i> (B)	34 % / 49 %		<i>Melanocarpus albomyces</i> <i>Neurospora crassa</i>	35 % / 51 % 35 % / 52 %
9	<i>Cryptococcus neoformans</i> (B)	33 % / 46 %		<i>Podospora anserina</i>	33 % / 53 %
10	<i>Phlebia radiata</i> (B)	32 % / 49 %		<i>Pleurotus ostreatus</i> (B)	32 % / 46 %
11	<i>Phanaerochaete chrysogenum</i> (B)	30 % / 46 %		<i>Auricularia auricula</i> (B)	31 % / 47 %
12				<i>Phanaerochaete chrysogenum</i> (B)	31 % / 49 %

Lacc3			Lacc4		
	Organismus	Homologie		Organismus	Homologie
1	<i>Fusarium proliferatum</i>	40 % / 57 %		<i>Cryptococcus neoformans</i> (B)	44 % / 57 %
2	<i>Botrytinia fuckeliana</i>	33 % / 51 %		<i>Flammulina velutipes</i> (B)	42 % / 52 %
3	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	32 % / 49 %		<i>Coprinopsis cinerea</i> (B)	41 % / 51 %
4	<i>Cryphonectria parasitica</i>	32 % / 48 %		<i>Fusarium proliferatum</i>	40 % / 53 %
5	<i>Botrytis cinerea</i>	31 % / 49 %		<i>Schizophyllum commune</i> (B)	40 % / 52 %
6	<i>Colletotrichum lagenarium</i> <i>Coprinus cinereus</i> (B)	31 % / 46 %		<i>Trametes hirsuta</i> (B)	40 % / 51 %
7	<i>Melanocarpus albomyces</i> <i>Podospora anserina</i> <i>Rigidoporus microporus</i> (B)	30 % / 45 %		<i>Pleurotus ostreatus</i> (B) <i>Pleurotus sajor-caju</i> (B) <i>Coprinus cinereus</i> (B)	39 % / 53 %
8	<i>Phlebia radiata</i> (B)	29 % / 44 %		<i>Trametes pubescens</i> (B) <i>Trametes versicolor</i> (B) <i>Trametes villosa</i> (B)	38 % / 51 %
9	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (B)	29 % / 42 %		<i>Lentinula edodes</i> (B)	37 % / 56 %
10	<i>Neurospora crassa</i>	28 % / 45 %		<i>Polyporus ciliatus</i> (B) <i>Auricularia auricula</i> (B)	37 % / 50 %

In Abbildung 63 und 64 werden die Kupferbindestellen der vier bekannten Laccasen aus *H. acidophila* untereinander und mit Laccasen aus einigen anderen Pilzen verglichen. Ausgewählt wurden dazu die Pilze, deren Laccasen insgesamt die höchsten Homologien zu der entsprechenden Laccase aus *H. acidophila* aufwiesen (Tab. 21). Die Abbildung 63 zeigt, dass die Sequenzen der Kupferbindestellen zwischen Lacc1 bis Lacc4 relativ stark variieren, was mit den geringen Identitätswerten dieser Laccasen untereinander korreliert (Tab. 20). Vollständig konserviert sind jedoch die für die Kupferbindung besonders wichtigen Histidinreste (vergleiche Abb. 69). Die Kupferbinderegionen cbs3 und cbs4 sind am stärksten konserviert.

	cbs1	cbs2	int
Lacc 1	HWHGLIQH	TSFYHSHY	GQRSDIIV
Lacc 2	HFHGVQRN	SSWWHSHF	GQRYDLIL
Lacc 3		SSMYHAHY	SQRADVLI
Lacc 4	HWHGLSMR	TSWYHSHN	
	cbs3	cbs4	
Lacc 1	HPMHMHGH	HCHIAWH	
Lacc 2	HPIH LHGH	HCHIGWH	
Lacc 3	HPIHMHGH		
Lacc 4			

Abb. 63: Sequenzvergleiche der Laccasen aus *H. acidophila* untereinander. Verglichen wurden die für die Primerableitung verwendeten cbs- und int-Regionen. Dunkelgrau unterlegte Aminosäuren sind identisch, hellgrau unterlegte Aminosäuren sind ähnlich.

Trotz dieser Sequenzunterschiede zwischen den *H. acidophila*-Laccasen zeigte sich, dass die Kupferbindestellen und die int-Region jeder der vier Laccasen Entsprechungen in den Sequenzen anderer Laccasen finden (Abb. 64). Während bei Lacc1 alle cbs-Regionen recht gut mit cbs-Regionen aus anderen Laccasen abzugleichen waren, galt dies bei Lacc2 vor allem für cbs2, int und cbs3. Bei Lacc3 ist cbs3 am stärksten konserviert, während bei Lacc4 die beiden bekannten cbs-Regionen gleich gut konserviert sind.

	cbs1	cbs2	int
<i>H. acidophila</i>	HWHGLIQH	TSFYHSHY	GQRSDIIV
<i>F. proliferatum</i>	HWHGILQK	TSWYHSHY	GQRTDVLV
<i>B. fuckeliana</i>	HWHGIRQL	TTWYHSHF	GQRYDVIV
<i>C. parasitica</i>	HWHGIRQL	TSWYHSHF	GQRYDVTI
<i>G. graminis</i>	HWHGLHQR	TTWYHSHF	GQRYDVIV
<i>N. crassa</i>	HWHGMHQR	TSWYHSHF	GQRYDVI I
<i>R. microporus</i>	HWHGFFQH	TFWYHSHL	GQRYSIIV

	cbs3	cbs4	
<i>H. acidophila</i>	HPMHMHGH	HCHIAWH	
<i>F. proliferatum</i>	HPMHLHGF	HCHIDS-	
<i>B. fuckeliana</i>	HPIHLLHGH	HCHIAWH	
<i>C. parasitica</i>	HPIHLLHGH	HCHIAWH	
<i>G. graminis</i>	HPIHLLHGH	HCHIAWH	
<i>N. crassa</i>	HPIHLLHGH	HCHIAWH	
<i>R. microporus</i>	HPIHLLHGH	HCHIDWH	Lacc1

	cbs1	cbs2	int
<i>H. acidophila</i>	HFHGVQRN	SSWWHSHF	GQRYDLIL
<i>B. fuckeliana</i>	HWHGIRQL	SSWYHSHF	GQRYDIIV
<i>G. graminis</i>	HWHGLHQR	SSWYHSHF	GQRYDVIV
<i>B. cinerea</i>	HWHGIRQL	SSWYHSHF	AQRYDIIV
<i>G. cingulata</i>	- - - - -	- - WYHSHF	GQRYDVIV
<i>C. lagenarium</i>	HWHGMHQR	TSWYHSHF	GQRYDVI I
<i>F. proliferatum</i>	HWHGIFQN	SSWYHSHF	GQRYHVV L
<i>P. ostreatus</i>	HWHGLFVK	TFWYHSHL	GQRYSLVL

	cbs3	cbs4	
<i>H. acidophila</i>	HPIHLLHGH	HCHIGWV	
<i>B. fuckeliana</i>	HPIHLLHGH	HCHIAWH	
<i>G. graminis</i>	HPIHLLHGH	HCHIGWH	
<i>B. cinerea</i>	HPIHLLHGH	HCHIAWH	
<i>G. cingulata</i>	HPIHLLHGH	- - - - -	
<i>C. lagenarium</i>	HPIHLLHGH	HCHIAWH	
<i>F. proliferatum</i>	HPIHLLHGH	HCHIAS-	
<i>P. ostreatus</i>	HPIHLLHGH	HCHIDWH	Lacc2

	cbs2	int	cbs3
<i>H. acidophila</i>	SSMYAHAY	SQRADVLI	HPIMMHGH
<i>F. proliferatum</i>	TSWYHSHY	GQRTDVLV	HPMHLHGF
<i>B. fuckeliana</i>	TTWYHSHY	GQRYDVIV	HPIHLLHGH
<i>G. graminis</i>	TTWYHSHF	GQRYDVIV	HPIHLLHGH
<i>C. parasitica</i>	TSWYHSHF	GQRYDVTI	HPIHLLHGH
<i>B. cinerea</i>	SSWYHSHF	AQRYDVIV	HPIHLLHGH
<i>C. cinereus</i>	TFWYHSHF	GQRYSFVL	HPFHLLHGH

Lacc3

	cbs1	cbs2	
<i>H. acidophila</i>	H F H G L S M R	T F W Y H S H N	
<i>C. neoformans</i>	H W H G L R Q L	T Y W W H S H Y	
<i>F. velutipes</i>	H W H G L F Q R	T F W Y H S H L	
<i>C. cinereus</i>	H W H G M F Q R	T F W Y H S H H	
<i>F. proliferatum</i>	H W H G M Y Q N	T Y W Y H S H T	
<i>S. commune</i>	H W H G F F Q K	T F W Y H S H L	
<i>T. hirsuta</i>	H W H G F F Q H	T F W Y H S H L	Lacc4

Abb. 64: Sequenzvergleiche der Laccasen aus *H. acidophila* mit Laccasen aus anderen Pilzen. Verglichen wurden die für die Primerableitung verwendeten cbs- und int-Regionen. Dunkelgrau unterlegte Aminosäuren sind identisch, hellgrau unterlegte Aminosäuren sind ähnlich. Die Zugangsnummern der angegebenen Organismen sind in Tabelle 21 nachzulesen.

Diese Sequenzvergleiche verdeutlichen, dass die Laccasen von *H. acidophila*, trotz geringer Konservierung zueinander und niedriger Homologie zu anderen Laccasen bei Betrachtung des gesamten Proteins, in den für die Katalyse wichtigen Kupferbinderegionen eindeutig die für Laccasen typischen Aminosäurereste aufweisen.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass *Hortaea acidophila* Laccasen bildet, welche sowohl ins Medium sezerniert werden als auch mit den Zellen assoziiert bleiben. Zudem gelang es, genomische DNA-Sequenzen von vier Laccasegenen zu amplifizieren, die eine relativ geringe Homologie zueinander und zu anderen Laccasen aufweisen, was auf eine evolutive Entfernung von *H. acidophila* zu anderen Pilzen hinweist. Die vollständige DNA-Sequenz zweier dieser Gene wurde bestimmt, von den beiden anderen Genen liegen Teilsequenzen vor. *H. acidophila* ist bislang das erste Mitglied der Ordnung Dothideales, in dem eine Laccase beschrieben und Laccasegene sequenziert worden sind.

4.1 Nachweis einer Laccase von *H. acidophila*

Zu Beginn dieser Arbeit gab es Hinweise dafür, dass *H. acidophila* eine extrazelluläre Oxidase bildet (Pracht, 2002). Die Vermutung, dass es sich bei diesem Enzym um eine Laccase handelt, lag nahe, da der Pilz zu den Ascomyceten gehört und Melanin bildet (Hölker *et al.*, 2004). Ascomyceten produzieren in der Regel DHN-Melanin, an dessen Synthese häufig eine Laccase beteiligt ist (Butler & Day, 1998). Auch für einige Vertreter der Dothideales, darunter der nächste Verwandte von *H. acidophila*, *H. werneckii*, ist die Synthese von DHN-Melanin nachgewiesen (Kogej *et al.*, 2004). Dieser Nachweis wird häufig durch spezifische Hemmung des DHN-Syntheseweges durch Tricyclazol geführt. Wurde z. B. der DHN-Melanin-Produzent *Gaeumannomyces graminis* mit Tricyclazol im Medium angezogen, so waren die Kulturen rötlich-braun statt schwarz gefärbt (Caesar-Tonthat *et al.*, 1995). Auch bei *H. acidophila* trat eine rötliche Färbung bei Tricyclazol-Zugabe auf (Bend, 2005), was auf eine gestörte Melaninsynthese hinweist. Eine Laccase aus einem acidophilen Pilz versprach interessante Eigenschaften für die biotechnologische Nutzung. Die Existenz von Laccasen wurde deshalb über laccasespezifische Antikörper sowie über die oxidative Aktivität dieser Enzyme nachgewiesen. Eine lösliche extrazelluläre Oxidase wurde zusätzlich auf Grund von Kupferabhängigkeit und Substratspektrum als Laccase charakterisiert.

4.1.1 Extrazelluläre Lokalisation der Oxidase

Laccasen sind in erster Linie extrazelluläre Enzyme (Thurston, 1994). Sie werden entweder ins Medium sezerniert oder liegen assoziiert mit der Zellwand vor. Meist sind die Proteine nicht kovalent mit der Zellwand verknüpft, sondern liegen mit Melaninfragmenten komplexiert vor und werden mit diesem zusammen in die Zellwand eingelagert. Da sie über die Zellmembran transportiert werden, sind sie extrazelluläre Proteine, auch wenn sie mit den

Zellen assoziiert bleiben. Nur wenige Studien diskutieren das Vorkommen von intrazellulären Laccasen (Leitner *et al.*, 2002; Schlosser *et al.*, 1997, Nagai *et al.*, 2003). Auf Grund ihrer unspezifischen Wirkungsweise ist es unwahrscheinlich, dass aktive Laccasen frei im Cytoplasma vorliegen. Tanaka *et al.* (1992) wiesen in *Cochliobolus heterostrophus* eine intrazelluläre Laccase nach, blieben jedoch den Beweis der Funktionsfähigkeit im Cytoplasma schuldig. Möglich ist die Lokalisation einer intrazellulären Laccase in Melanosomen, d. h. Organellen, die von einer Membran umschlossen sind. Solche Melanosomen können elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden, da sie Melanin bzw. Melaninvorstufen enthalten, die durch elektronendichte Osmiumionen markiert werden. Bei *Cladosporium carrionii*, einem Vertreter der Dothideales sind solche Melanosomen beschrieben (Sanchez-Mirt *et al.*, 1997), und auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *H. acidophila* sind ebenfalls Organellen sichtbar, die Melanosomen darstellen könnten (Hölker *et al.*, 2004). *Aureobasidium pullulans* besitzt der Zellwand aufgelagerte melaninhaltige Vesikel, doch noch ist unbekannt, ob die Melaninsynthese erst in der Zellwand erfolgt oder bereits in den im Cytoplasma liegenden Vesikeln (Caesar-Tonthat *et al.*, 1995).

Der durchgeführte ABTS-Plattentest zeigte, dass *H. acidophila* eine extrazelluläre Oxidase produziert. Um die Oxidaseaktivität quantifizieren zu können, wurde diese im Kulturüberstand einer Flüssigkultur und assoziiert mit den Zellen gemessen (Abb. 13). In beiden Fraktionen war Aktivität nachweisbar, doch trat sie im Kulturüberstand zeitverzögert auf, was vermutlich mit dem zeitaufwändigen Transport des Enzyms über die Cytoplasmamembran zusammenhängt. Für diesen Export wird in der Regel eine N-terminale Signalsequenz benötigt (Alberts *et al.*, 1994). Das zellassoziierte Enzym kann entweder wie das lösliche Enzym über die Membran transportiert werden, oder es gelangt über Melanosomen nach draußen, die mit der Membran fusionieren. In diesem Fall könnten beide Laccasen den hypothetischen Proteinen Lacc1 und Lacc2 zugeordnet werden, von denen nur Lacc1 eine Signalsequenz trägt (Abb. 59). Das Programm Psort ermittelte für Lacc1 eine 77,8 %ige Wahrscheinlichkeit ein extrazelluläres oder mit der Zellwand assoziiertes Protein zu sein. Für Lacc2 beträgt die Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im Cytoplasma 69,6 %, wobei vor allem die fehlende Signalsequenz eine Rolle spielt. Da nicht bekannt ist, wie Laccasen in die Melanosomen gelangen, ist es möglich, dass diese Enzyme biochemisch betrachtet cytoplasmatische Proteine sind. Sicherlich ist es ebenso möglich, dass es sich bei den beiden enzymatisch nachgewiesenen Laccasen um die gleiche Laccase handelt. Dies ist jedoch durch den Fund mehrerer Laccasegene und die Markierung von Proteinen unterschiedlicher Größe durch laccasespezifische Antikörper unwahrscheinlich geworden.

4.1.2 Kupferabhängigkeit der Oxidase

Außer Laccasen können auch Tyrosinasen, Katalasen oder Peroxidasen den letzten Schritt der Melaninsynthese katalysieren (Butler & Day, 1998). Durch den Nachweis einer Kupferabhängigkeit der im Kulturüberstand lokalisierten Oxidase konnten die Hämenzyme Katalase und Peroxidase als Erklärung für die gemessene Oxidaseaktivität ausgeschlossen werden. Zudem ist die Sekretion von H_2O_2 bei Ascomyceten nicht bekannt (Bell & Wheeler, 1986), so dass eine extrazelluläre Peroxidase nicht aktiv sein könnte. Nur die ebenfalls kupferabhängige Tyrosinase kam außer der Laccase weiterhin für die Oxidaseaktivität in Betracht.

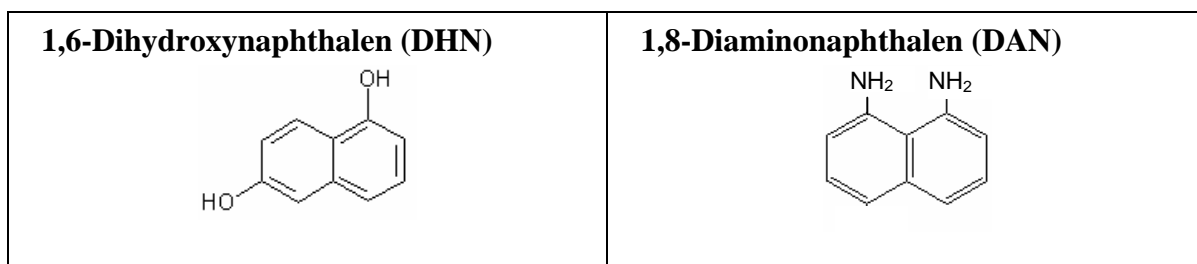
Die Laccase benötigt zur Katalyse Kupfer im aktiven Zentrum. Aus diesem Grunde kann nur aktives Enzym gebildet werden, wenn Kupfer im Medium vorhanden ist, wie bei Zugabe von $0,04 \mu M$ $CuSO_4$ der Fall war (Abb. 14). Wurde *H. acidophila* ohne Kupfer im Medium angezogen, war bis auf eine geringe Restaktivität keine Oxidaseaktivität nachweisbar, was auf eine Kupferabhängigkeit des Enzyms hinweist (Abb. 14). Die Restaktivität wurde durch Kupfer eintrag über Trypton ins Medium ermöglicht, da die Verwendung von Minimalmedium auf Grund des schlechten Wachstums der Hefe ausgeschlossen war. Die starke Zunahme der Aktivität bei weiterer Erhöhung der Kupferkonzentration von $0,04 \mu M$ auf $250 \mu M$ lässt sich nicht alleine mit dem Einbau von Kupfer in das inaktive Apoenzym erklären. Wahrscheinlicher ist, dass es zusätzlich zu diesem Effekt zu einer Induktion auf Transkriptionsebene kommt, wie für einige Pilze beschrieben. Nach Galhaup & Haltrich (2001) führt Kupferzugabe bei vielen Pilzen zu höherer Laccaseausbeute, eine Induktion auf Transkriptionsebene ist z. B. für *Trametes versicolor* (Collins & Dobson, 1997), *Pleurotus ostreatus* (Palmieri *et al.*, 2001) oder dem Ascomyceten *Gaeumannomyces graminis* (Litvintseva & Henson, 2002) nachgewiesen. Bei *Pleurotus ostreatus* sind zudem MRE-Regulationselemente in den Laccasegenen nachweisbar, die Kupfer binden können, wodurch die Transkription induziert wird (Faraco *et al.*, 2003). Mögliche Regulationselemente im 5'-terminalen Bereich der Gene *lacc1* und *lacc2* legen diese Schlussfolgerung ebenfalls für *H. acidophila* nahe (Abb. 52 und 55).

Ohne Kupferzugabe im Medium wächst *H. acidophila* schlechter als bei Zugabe von $0,04 \mu M$ $CuSO_4$, da Pilze Kupferkonzentrationen von $1-10 \mu M$ zum Wachstum benötigen (Galhaup & Haltrich, 2001). Wurde *H. acidophila* in Minimalmedium ohne Trypton und ohne Kupferzusatz angezogen, kam es deshalb zu keinem sichtbaren Wachstum (nicht gezeigt). Auch bei hohen Kupferkonzentrationen nahm das Wachstum ab. Das beruht darauf, dass Kupfer in großen Mengen toxisch ist, allerdings ist dieser Effekt bei niedrigem pH-Wert weniger stark ausgeprägt als bei neutralem pH-Wert (Gadd, 1993). Vielleicht ist dadurch zu erklären, dass *H. acidophila* selbst bei $1 mM$ $CuSO_4$ im Medium wachsen kann (Bend, 2005). Ein weiterer

Grund hierfür kann die Schutzfunktion der melaninhaltigen Zellwand sein (Bell & Wheeler, 1986). So kommt es z. B. bei *Aureobasidium pullulans* zu verstärkter Pigmentierung als Reaktion auf Kupferzugabe (Caesar-Tonthat *et al.*, 1995).

4.1.3 Substratspezifität der Oxidase

Laccasen oxidieren ein breites Spektrum an Substraten, darunter in erster Linie Polyphenole und methoxysubstituierte Monophenole (Abb. 65). Nicht-substituierte Monophenole wie Tyrosin werden dagegen nicht oxidiert, so dass eine Unterscheidung zu den Tyrosinasen (Monophenoloxidase, Catecholoxidase) möglich ist. Da es sich bei der untersuchten Oxidase auf Grund der Unfähigkeit zur Tyrosinoxidation nicht um eine Tyrosinase handeln kann, ist das Enzym mit großer Wahrscheinlichkeit eine Laccase. Dass typische Laccasesubstrate wie Syringaldazin und L-DOPA nicht oxidiert werden können, muss nicht gegen eine Laccase sprechen, da viele Faktoren die Oxidierbarkeit eines Substrates beeinflussen wie z. B. das Redoxpotenzial (Xu, 1996), das für die Laccasen von *H. acidophila* noch nicht untersucht ist. Die Tatsache, dass Lacc1 und Lacc2 Klasse-2- bzw. Klasse-3-Laccasen sind (siehe 4.4.2), spricht jedoch dafür, dass sie ein mittleres bis stark elektropositives Redoxpotenzial aufweisen. Das Substratspektrum wurde nur für die extrazelluläre, lösliche Laccase bestimmt. Handelt es sich dabei um Lacc1 mit einem mittleren elektropositiven Redoxpotenzial wie postuliert, könnte dies die mangelnde Fähigkeit zur Oxidation einiger Substrate erklären. Das natürliche Substrat der Laccasen aus *H. acidophila* ist wahrscheinlich der Grundbaustein des DHN-Melanins, 1,8-DHN. Da dieses Substrat nicht erhältlich war, wurde 1,6-DHN verwendet, welches ebenso wie 1,8-DAN oxidiert wurde. Dieser Versuch zeigte, dass eine Hydroxygruppe für die Oxidation nicht notwendig ist, da auch Diamine wie DAN umgesetzt werden. Das einkernige methoxysubstituierte Monophenol DMOP wurde weniger gut oxidiert als die mehrkernigen Aromaten, was mit der Vermutung übereinstimmt, dass es sich bei dem mehrkernigen DHN um das natürliche Substrat der Laccase handelt.



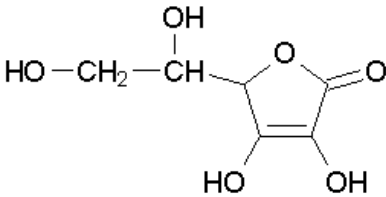
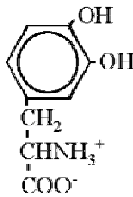
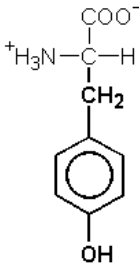
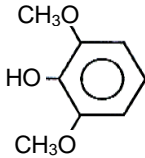
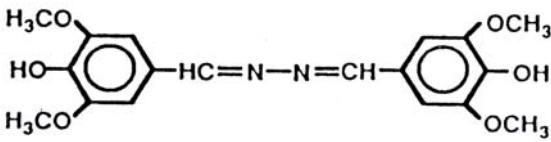
Ascorbinsäure 	L-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) 
Tyrosin 	2,6-Dimethoxyphenol (DMOP) 
Syringaldazin 	

Abb. 65: Substrate, die der extrazellulären Laccase zur Oxidation angeboten wurden. Es handelt sich um mehrkernige Polyphenole und Diamine, einkernige Polyphenole, einkernige Monophenole und methoxysubstituierte Monophenole und um nicht-phenolische Substanzen wie die Ascorbinsäure.

4.1.4 Existenz von Laccasen in *H. acidophila*

Sowohl im Kulturüberstand als auch mit den Zellen assoziiert konnten Laccasen über laccase-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Da diese Antikörper gegen die Oberfläche der Proteine gerichtet sind und nicht die konservierten Kupferbinderegionen erkennen, ist davon auszugehen, dass es sich bei den nachgewiesenen Proteinen um Laccasen und nicht um andere Kupferbindepoteine handelt. Die beiden antikörpermarkierten Proteine sind unterschiedlicher Größe, was darauf hinweist, dass in *H. acidophila* mehrere Laccasen existieren und die Antikörper jeweils an andere Laccasen binden. Während der Antikörper gegen die Laccase des Ascomyceten *Melanocarpus albomyces* in der Überstandsfraction und in der Zellextraktfraction ein Protein gleicher Größe markierte, war das von dem Antikörper gegen die Laccase des Basidiomyceten *Ceriporiopsis subvermispora* markierte Protein im Überstand deutlich kleiner als das markierte zellassoziierte Protein. Dass im Überstand und im Zellextrakt verschiedene Laccasen vorliegen, wurde inzwischen nachgewiesen (Bend, 2005). Durch die Markierung von Proteinen von *H. acidophila* durch laccasespezifische Antikörper ist bewiesen, dass der Pilz Laccasen besitzt. Zwar ist die Western Blot Analyse kein Beweis dafür, dass es sich bei den markierten Proteinen um die enzymatisch nachgewiesenen Oxidasen handelt, doch ist dies auf Grund der diskutierten Eigenschaften dieser Oxidasen sehr wahrscheinlich.

4.1.5 Beteiligung der Oxidase an der Melaninsynthese

Die oben diskutierten Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass es sich bei der löslichen, extrazellulären Oxidase tatsächlich um eine Laccase handelt. Die zellassoziierte Oxidase wurde nicht auf Kupferabhängigkeit und Substratspektrum hin untersucht, doch ist davon auszugehen, dass es sich auch bei diesem Enzym um eine Laccase handelt. Sie ist in der melaninkrustierten Zellwand lokalisiert und es konnte eine zellassoziierte Laccase mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Die Beteiligung einer dieser oder auch beider Laccasen an der Melaninsynthese ist wahrscheinlich, und ein deutlicher Hinweis ist die kompetitive Hemmung der Melaninsynthese durch Zugabe von Ascorbinsäure. Das oxidative Enzym verwendet in diesem Fall die Ascorbinsäure als Substrat und kann deshalb 1,8-DHN nicht mehr zum Melanin oxidieren. Die Zellen produzieren allerdings weiterhin Melaninvorstufen, welche nach Verbrauch der Ascorbinsäure schlagartig zu Melanin vernetzt werden. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass Melanin bei *H. acidophila* überall dort vorzukommen scheint, wo eine Laccase vermutet wird: im Kulturüberstand, in der Zellwand und in den intrazellulären Melanosomen (Hölker *et al.*, 2004; Tetsch *et al.*, 2005). Der letztendliche Beweis für die Beteiligung der Laccase an der Melaninsynthese kann jedoch nur mit spezifischen Inhibitoren des Enzyms erbracht werden oder mit Knockout-Experimenten, bei denen die Laccasegene gezielt ausgeschaltet werden.

Die Frage nach der Funktion des Melanins bei *H. acidophila* wurde durch Anzuchtversuche mit gehemmter Melaninsynthese untersucht. In diesen Versuchen schützte Melanin die Zellen vor hohen Kupferkonzentrationen, jedoch nicht gegen andere Stressfaktoren wie sichtbares Licht und niedrige pH-Werte. Auch eine Schutzwirkung gegen UV-Strahlung (254 nm) ist wahrscheinlich, da Zellen bei Bestrahlungsversuchen hohe Resistenz zeigten (nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass Melanin gegen UV-Strahlung schützt und Kupfermoleküle abfangen kann (Bell & Wheeler, 1986; Gadd & de Rome, 1988). Dabei reguliert Kupfer die Synthese der Laccasen, so dass bei starker Belastung mehr Melanin gebildet wird. Gleichzeitig fangen auch Laccasen direkt Kupfer ein, da die Atome in das Enzym eingebaut werden. Auch wenn dieser Effekt gering scheint, wird er als Kupferresistenzmechanismus bei *Pseudomonas syringae* diskutiert (Cha & Cooksey, 1991). Bei einigen Pilzen wird die Melaninsynthese schon bei nicht-toxischen Kupferkonzentrationen hochreguliert. Hier wird Melanin wahrscheinlich genutzt, um Kupferionen einzufangen und für den Metabolismus bereitzustellen (Caesar-Tonthat *et al.*, 1995).

Eine Laccase kann möglicherweise verschiedene Funktionen ausüben (Lyons *et al.*, 2003). Auch die Aufgaben von löslicher und zellassoziiierter Laccase von *H. acidophila* können sich

unterscheiden. So könnte die zellassozierte Laccase an der Melaninsynthese beteiligt sein, während die extrazelluläre, frei vorliegende Laccase die Detoxifizierung von phenolischen Komponenten durchführt. Viele der nahen Verwandten von *H. acidophila* sind Pflanzenpathogene (siehe auch 4.4.3), bei denen eine Fähigkeit zur Detoxifizierung von Phytoalexinen ein evolutiver Vorteil ist. Weitere Verwandte leben auf Steinen, wo Melanin sicherlich Schutz vor UV-Licht und Austrocknung bietet (Butin *et al.*, 1996; Eriksson, 1981). *H. acidophila* wurde von Braunkohle isoliert, so dass es ebenfalls möglich wäre, dass die sezernierte Laccase zum Abbau dieser Substanz dient. Das gebildete Melanin könnte ein Schutz vor sauren, kupferhaltigen Minenabwässern sein, die in ehemaligen Kupferminen (Konstantinidis *et al.*, 2003) und Braunkohleabbaugebieten häufig vorkommen. In Braunkohletagebauen oxidieren Bakterien Sulfidminerale und säuern den Boden durch die dabei gebildete Schwefelsäure stark an (Madigan *et al.*, 2000). Die Fähigkeit zu Wachstum bei niedrigen pH-Werten macht vor diesem Hintergrund Sinn, und es erscheint interessant zu untersuchen, ob *H. acidophila* verschiedene Laccasen in Abhängigkeit des Anzucht-pH-Wertes bildet. Eine Beteiligung der löslichen Laccase an der Melaninsynthese ist ebenso möglich, da *H. acidophila* in der natürlichen Umgebung auf festen Substraten wächst, wo dieses Enzym möglicherweise lange genug in räumlicher Nähe der Zellen verbleibt, um an der Melaninsynthese teilzunehmen zu können.

Laccasen können auch Virulenzfaktoren sein. Viele Pflanzenpathogene produzieren Laccasen (Asiegbu *et al.*, 2004), und viele Vertreter der Dothideales und Chaetothyriales sind humanpathogen. Nach Hamilton & Gomez, 2002, sind pigmentierte Pilze wie *Exophiala dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus* und *Sporothrix schenckii*, eine wachsende Gefahr für immunsuppressive Menschen. Patienten mit Phaeoblastomykosen sterben in 79 % aller Fälle (Revankar *et al.*, 2002) und die Medikation bei Chromoblastomykosen ist immer noch schwierig, so dass Infektionen oft 20 Jahre andauern (de Hoog *et al.*, 2000). Dies hängt damit zusammen, dass die melanisierten Zellwände die Zellen vor Antibiotika und dem Immunsystem schützen. *H. acidophila* wächst bei 37 °C nicht mehr und ist deshalb trotz seiner nahen Verwandtschaft zu opportunistischen Pilzen wie *H. werneckii* sicher nicht humanpathogen. Selbst auf der Haut mit geringerer Temperatur ist Wachstum wohl nicht oder zumindest nur sehr langsam möglich. Außerdem kann man bei *H. werneckii* weniger von echter Pathogenität sprechen als von einer Anpassung an halophile Standorte, zu denen die Haut gehört (Zaler *et al.*, 1999). *H. acidophila* ist dagegen nicht halophil.

4.2 Nachweis der Laccasegene von *H. acidophila*

Nachdem feststand, dass *H. acidophila* Laccasen besitzt, sollten die dazugehörigen Gene nachgewiesen werden. Da ascomycetische Laccasen relativ schwach konserviert sind (Berka *et al.*, 1997), ist das Auffinden der für sie kodierenden Gene über Sequenzvergleiche häufig nicht möglich. Ein erster Nachweis der Gene erfolgt daher meist über PCR, für deren Erfolg die Wahl der Primer entscheidend ist. Ausgehend von einer bekannten Proteinsequenz können spezifische Primer abgeleitet werden, was bei *H. acidophila* jedoch nicht möglich war, weil die Laccasen bisher weder aufgereinigt noch sequenziert sind. Ein weiteres Problem zu Beginn der Arbeit war, dass Vertreter der Ordnung Dothideales bisher so gut wie nicht genetisch untersucht wurden, so dass die meisten gängigen molekularbiologischen Methoden neu etabliert werden mussten.

4.2.1 Extraktion von Nukleinsäuren

Für den Nachweis der Laccasegene wurde genomische DNA benötigt. Die melaninhaltige Zellwand ist sehr stabil und erschwert die meisten Verfahren des Zellaufschlusses. Aus diesem Grund wurden mehrere Methoden auf ihre Tauglichkeit hin untersucht. Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Systems speziell für Hefen und andere Pilze mit stabilen Zellwänden gelang der Zellaufschluss, doch band die DNA nicht an die verwendete Bindematrix, wie gezeigt werden konnte, nachdem DNA durch andere Methoden isoliert worden war. Ebenso scheiterte die Isolierung von mRNA über das Dynabead-System, weil nur eine schwache Bindung an die verwendete Bindematrix erfolgte. Da sich die Nukleinsäuren von *H. acidophila* in ihrer Struktur wohl nicht von Nukleinsäuren anderer Organismen unterscheiden, lässt sich dieser Effekt nur durch die Anwesenheit von Melanin erklären. Melanin ist ebenso wie DNA negativ geladen und verdrängt die Moleküle so möglicherweise von den Bindestellen an der Silicamatrix. Ebenso könnte es die Anbindung von mRNA an den PolyT-Rest der Bindematrix stören. So ist z. B. bekannt, dass Melanin an die DNA-Polymerase binden und dadurch PCR und RT-PCR stören kann (Eckhart *et al.*, 2000). Nach einer RT-PCR konnte im Agarosegel cDNA nachgewiesen werden, was für die Isolierung von zumindest geringen mRNA-Konzentrationen aus *H. acidophila* spricht. Das Scheitern des Nachweises dieser cDNA in der PCR kann an zu geringer Konzentration der spezifischen mRNA, an störendem Melanin in den Proben oder an einem Mangel an passenden Haushaltsgenprimern (siehe 4.4.1) liegen.

Aus den genannten Gründen wurden daraufhin Isolierungsmethoden ohne Bindematrix verwendet. Für die DNA-Isolierung wurde eine Aufschlussmethode für filamentöse Pilze verwendet (Raeder & Broda, 1988) die sich jedoch für den Aufschluss der meist einzellig

wachsenden Hefe *H. acidophila* schlecht eignete, da ein Abfiltrieren der Zellen nicht möglich war. Auf Grund des so in den Proben verbleibenden Wassers wurde der mechanische Aufschluss mit Flüssigstickstoff sehr erschwert. Stattdessen wurde eine Aufschlussmethode für Hefen (Hoffmann & Winston, 1987) verwendet. Zwar ist die melaninhaltige Zellwand stabiler als die von *Saccharomyces spec.*, so dass die DNA-Ausbeute geringer ausfiel, aber stärkere mechanische Belastung bei Aufschluss wie die Verwendung des Ribolyser-Instruments schädigten die DNA (Abb. 16). Die für *Saccharomyces spec.* etablierte Methode war zur Isolierung genomischer DNA aus *H. acidophila* am besten geeignet und wurde als Standard etabliert.

Nach demselben Prinzip wurde Gesamt-RNA isoliert, welche jedoch extrem instabil war und durch RNasen sofort abgebaut wurde. Dies ließ sich auch durch schnelles und sauberes Arbeiten nicht verhindern. Zudem wurde genomische DNA als Verunreinigung mitisoliert, doch konnte diese durch DNase-I-Inkubation entfernt werden. Das verwendete Trizol-Reagenz soll den RNA-Abbau nach Angaben der Hersteller hemmen. Bei Verwendung von selbst hergestelltem Trizol-Reagenz wurde jedoch noch mehr genomische DNA als Verunreinigung isoliert und der Abbau von RNA war ebenfalls stärker. Dies kann daran liegen, dass *H. acidophila* selbst sehr aktive RNasen produziert, die mit dem Aufschluss frei gesetzt werden. Möglicherweise könnte die RNA-Isolierung möglich werden, wenn alle Chemikalien und Reaktionsgefäße in RNase-freier Qualität gekauft werden und ein spezieller RNA-Arbeitsplatz eingerichtet wird, da zur Durchführung anderer Methoden verwendete Arbeitsplätze meist mit RNasen verunreinigt sind und nur schwer dekontaminiert werden können. Obwohl bereits viele Methoden zur RNA-Isolierung etabliert sind, scheitert die RNA-Isolierung immer wieder auch bei anderen Organismen. So ist es z. B. bisher noch nicht gelungen, RNA aus Mycel von *Trametes pubescens* zu isolieren (Galhaup & Haltrich, 2001).

4.2.2 PCR mit laccasespezifischen Primern

Bislang kamen für den Nachweis von Laccasegenen ausschließlich Primer zum Einsatz, die von den stark konservierten Kupferbindedomänen abeleitet waren, sofern das kodierte Enzym nicht bekannt war. Bei *H. acidophila* wurden zuerst Primer verwendet, die von den Kupferbindedomänen basidiomycetischer Laccasen und der kupferhaltigen Dihydrogeodinoxidase abgeleitet worden waren. Da diese jedoch keine spezifischen Amplifikate lieferten, wurden für diese Arbeit neue Primer von ascomycetischen Laccasen abgeleitet (Abb. 19). Die Kupferbindestellen (cbs1-4) sind für die Ableitung von Primern bereits häufig beschrieben

(u. a. d'Souza *et al.*, 1996), die interne Sequenz (int) wurde dagegen in dieser Arbeit erstmalig für die Primerableitung benutzt.

Bei der anschließenden PCR mit diesen Primern lieferten nur cbs2, int und cbs3 Amplifikate. Es wurden drei Fragmente erhalten: cbs2/int, cbs2/3 und int/cbs3. An Hand von Sequenzvergleichen ließ sich eindeutig erkennen, dass es sich um Fragmente von Laccasegenen handelt und dass cbs2/int und int/cbs3 nicht zu dem gleichen Gen gehörten wie cbs2/3 (siehe 3.2.5.1). Folglich mussten mindestens zwei Laccasegene in *H. acidophila* vorliegen. Das größere Fragment cbs2/3 wurde vorerst als dem *lacc1*-Gen zugehörig bezeichnet, cbs2/int und int/cbs3 wurden zu *lacc2* zusammengefasst. Später stellte sich heraus, dass es sich um zwei verschiedene Gene handelt. Das int/cbs3-Fragment wurde deshalb als *lacc3* bezeichnet. Zusätzlich wurde eine Primerkombination cbs1/2 verwendet, die von basidiomycetischen Laccasen abgeleitet worden war. Sie lieferte ein Amplifikat, welches eine starke Homologie zu basidiomycetischen Laccasen aufwies. Hieraus ließ sich schließen, dass das Fragment cbs1/2 zu einem anderen Laccasegen gehört als die Fragmente cbs2/int, cbs2/3 und int/cbs3. Es wurde als dem *lacc4*-Gen zugehörig bezeichnet.

Bei Anwesenheit mehrerer Laccasegene sollten bei Verwendung jeder Primerkombination mehrere Fragmente amplifiziert werden. Über „Nested-PCR“ konnte nachgewiesen werden, dass die cbs2/3-Bande mindestens zwei Fragmente enthielt, die von *lacc1* und *lacc2* stammten (Abb. 31), wie durch Sequenzierung und Southern Blot geklärt wurde. Die Southern Blot Analyse mit restriktionsgespaltener DNA lieferte weitere Hinweise darauf, dass cbs2/3 und cbs2/int zu zwei verschiedenen Genen gehören, da bei Verwendung der gleichen Restriktionsenzyme aber verschiedener Sonden ein unterschiedliches Bandenmuster erhalten wurde. Pro Sonde und Restriktionsenzym wurde nur jeweils ein Fragment markiert, was darauf schließen ließ, dass die Sonde nur für ein Gen spezifisch war. Dies bedeutet wiederum, dass sich die unterschiedlichen Laccasegene deutlich voneinander unterscheiden. Wurde ein Southern Blot mit PCR-Produkten statt mit restriktionsgespaltener DNA durchgeführt, markierte die cbs2/int-Sonde ebenfalls das cbs2/3-PCR-Produkt, da dieses Fragmente beider Gene enthielt. Die Sonde cbs2/3 enthielt ebenfalls einen Teil von *lacc2*, markierte jedoch das cbs2/int-Fragment im Southern Blot nicht. Dies lässt sich dadurch erklären, dass mit der Primerkombination cbs2/3 das Fragment des *lacc1*-Gens wesentlich stärker amplifiziert wurde als das des *lacc2*-Gens (Tab. 22). Bei Anwesenheit hoher Konzentrationen der Sonde cbs2/int konnten die wenigen *lacc2*-spezifischen cbs2/3-Fragmente hoch spezifisch detektiert werden. Die Sonde cbs2/3 enthielt dagegen zu wenige *lacc2*-Moleküle, um das PCR-Produkt cbs2/int markieren zu können, da die Konzentration der Sonde kritisch für den Nachweis ist.

Um herauszufinden, ob *cbs2/int* und *int/cbs3* zu demselben Laccasegen gehören, sollte das *cbs2/3*-Fragment von *lacc2* isoliert werden. Die Fragmente ließen sich auf Grund des geringen Größenunterschieds in der Gelelektrophorese nicht trennen, konnten jedoch beide in Plasmide kloniert werden. Diese wurden durch PCR mit der Primerkombination *cbs2/int* daraufhin untersucht, welches Fragment sie trugen. Dieser Ansatz scheiterte jedoch daran, dass das *cbs2/3*-Fragment von *lacc2* in sehr geringer Menge amplifiziert wurde. Die meisten Bakterien trugen daher das Fragment des *lacc1*-Gens oder Fragmente beider Gene. Dies ist möglich, da *E. coli*-Zellen bei der Transformation mehrere Plasmide aufnehmen können.

4.2.3 Vergleich der verwendeten Primer mit den Laccasegensequenzen von *H. acidophila*

Auf Grund der Sequenzanalyse der Laccasegenfragmente war bekannt, dass mindestens 4 verschiedene Laccasegene in *H. acidophila* vorliegen. Theoretisch hätten alle diese Gene für jede Primerkombination ein Amplifikat liefern müssen. Warum dies nicht der Fall war, erklärt ein Vergleich der Primersequenzen mit den Gensequenzen. Tabelle 22 zeigt diesen Vergleich und hebt die Fehlstellen der Primer hervor. Betrachtet man eine bestimmte Primerkombination und die dazugehörigen Fehlstellen für ein Gen, lässt sich ableiten, ob das jeweilige Fragment des Gens mit diesen Primern hätte amplifiziert werden müssen.

Tab. 22: Vergleich der verwendeten Primer mit den dazugehörigen Sequenzen der Laccasegene von *H. acidophila*. Fehlstellen sind schwarz hinterlegt und als Fehler addiert. Ab circa 6-7 Fehlstellen kam es zu keiner Amplifikation mehr (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Primer	Codon								Fehler
	1	2	3	4	5	6	7	8	
cbs 1	CAC	TGG	CAT	GGC	AT(GC)	CAC	CAG	AAG	von 24
<i>lacc 1</i>	CAC	TGG	CAC	GGC	TTG	ATC	CAG	CAT	6
<i>lacc 2</i>	CAC	TTC	CAC	GGT	GTC	CGC	CAG	AAC	7
<i>lacc 4</i>	CAC	TGG	CAC	GGC	CTG	TCA	ATG	CGA	10
cbs 1B	ACC	ACG	GT(CT)	CAC	TGG	CAC	GGC		von 21
<i>lacc 1</i>	ACC	TCC	ATC	CAC	TGG	CAC	GGC		3
<i>lacc 2</i>	ACG	TCG	CTC	CAC	TTC	CAC	GGT		6
<i>lacc 4</i>	CTA	TCG	TTC	CAC	TGG	CAC	GGC		5
cbs 2	ACG	TC(GT)	TGG	TAC	CAC	T(GC)G	CAC	T(AT)C	von 24
<i>lacc 1</i>	ACG	TCC	TTC	TAC	CAC	TCG	CAC	TAC	3
<i>lacc 2</i>	TCG	TCT	TGG	TGG	CAC	TCT	CAC	TTC	4
<i>lacc 3</i>	TCG	AGC	ATG	TAC	CAC	GCA	CAC	TAC	8
<i>lacc 4</i>	ACA	TTC	TGG	TAT	CAT	TCT	CAC	AAC	7

Primer	Codon								Fehler
	1	2	3	4	5	6	7	8	
cbs 2B	AGC	GG(ACG)	ACA	TTC	TGG	TAC	CAC	AGC	von 21
<i>lacc 1</i>	TAC	GGC	ACG	TCC	TTC	TAC	CAC	TCG	9
<i>lacc 2</i>	TAC	GGC	TCC	TCT	TGG	TGG	CAC	TCT	11
<i>lacc 3</i>	TTC	GGC	TCC	AGC	ATG	TAC	CAC	GCA	11
<i>lacc 4</i>	AGC	GGG	ACA	TTC	TGG	TAT	CAT	TCT	5
int	GG(AC)	CAG	CGC	TAC	GAC	GT(GC)	ATC	ATC	von 21
<i>lacc 1</i>	GGA	CAA	CGG	TCG	GAC	ATC	ATC	GTC	6
<i>lacc 2</i>	GGC	CAA	CGC	TAC	GAC	CTG	ATC	CTG	4
<i>lacc 3</i>	AGC	CAG	CGC	GCA	GAC	GTG	CTC	ATC	5
cbs 3	CAC	CC(CG)	ATC	CTC	CTG	CAC	GG(GC)		von 21
<i>lacc 1</i>	CAC	CCG	ATG	CAC	ATG	CAC	GGC		2
<i>lacc 2</i>	CAC	CCC	ATC	CAT	CTC	CAC	GGC		3
<i>lacc 3</i>	CAC	CCC	ATC	CAC	ATG	CAC	GGG		2
cbs 4	CAC	TGC	CAC	ATC	GCC	TGG	CAC		von 21
<i>lacc 1</i>	CAC	TGC	CAC	ATC	GCG	TGG	CAT		2
<i>lacc 2</i>	CAC	TGC	CAC	ATT	GGC	TGG	CAC		2

Die Primerkombination cbs1B/2B passt gut zu *lacc4*, was die experimentellen Daten bestätigt. Der Primer cbs1 ist an alle Gene schlecht angepasst und lieferte deshalb keine Ergebnisse, cbs1B hätte dagegen für *lacc1* mit weiteren Kombinationen Amplifikate liefern müssen. Der Primer cbs2B war abgesehen von *lacc4* an alle Laccasegene schlecht angepasst. Die Primerkombination cbs2/int passt am Besten zu *lacc2*, amplifizierte jedoch auch ein Fragment des *lacc1*-Gens, wie die „Nested PCR“ zeigte. Auf genomischer DNA wurde ebenfalls eine Bande der entsprechenden Größe amplifiziert, doch handelte es sich um ein unspezifisches Amplifikat. Möglicherweise hatten sich im Gel mehrere Banden überlagert, so dass eine falsche Bande isoliert wurde. Die Primerkombination cbs2/3 amplifizierte das Fragment von *lacc1* am Besten und das von *lacc2* weitaus schwächer. Bei Verwendung von cbs2/3* wurde nur das Fragment von *lacc1* amplifiziert, wie an Hand der Amplifikation nur einer Bande in der „Nested PCR“ nachgewiesen wurde (Abb. 37, Spur 4). Der Primer cbs3* passt auf beide Sequenzen schlechter als cbs3 eingesetzt (Tab. 7a), doch ist dieser Effekt bei *lacc2* stärker als bei *lacc1*, so dass die sowieso schon schwächere Amplifikation von *lacc2* ganz unmöglich wurde. Ein Fragment von *lacc3* konnte mit dieser Primerkombination nicht amplifiziert werden, was erklärt, warum eine „Nested PCR“ mit int/cbs3 auf cbs2/3-PCR-Produkten nur unspezifische Signale lieferte (nicht gezeigt). Die Primerkombination int/3 passt am Besten zur Sequenz von *lacc3*, welches als einziges amplifiziert wurde. Dennoch sind die Primer theoretisch nicht

wesentlich schlechter für die Amplifikation von *lacc1* und *lacc2* geeignet. Da die Fragmentgrößen relativ ähnlich sind (Tab. 23), ist es nicht ausgeschlossen, dass sich Spuren der anderen Produkte in der einzig sichtbaren Bande befinden und deshalb übersehen wurden.

Tab. 23: Berechnete Größen der durch eine bestimmte Primerkombination theoretisch zu amplifizierenden Fragmente. Die Fragmentgrößen wurden an Hand der bekannten Sequenzen für alle vier Laccasegene aus *H. acidophila* errechnet. Fett gedruckt sind die Fragmente, die ursprünglich in der PCR amplifiziert wurden, fett und kursiv sind die Fragmente, die nach Isolation der vollständigen Gene zur Kontrolle mit dem Advantage-GC Genomic PCR Kit amplifiziert wurden (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

	<i>lacc1</i>	<i>lacc2</i>	<i>lacc3</i>	<i>lacc4</i>
1/2	143 bp	143 bp	/	153 bp
1/int	716 bp	561 bp	/	/
1/3	1214 bp	1029 bp	/	/
1/4	1418 bp	1218 bp	/	/
2/int	597 bp	441 bp	579 bp	/
2/3	1092 bp	909 bp	1065 bp	/
2/4	1298 bp	1098 bp	/	/
int/3	521 bp	492 bp	506 bp	/
int/4	725 bp	681 bp	/	/
3/4	227 bp	212 bp	/	/

Der Primer cbs4 konnte nur für *lacc1* und *lacc2* untersucht werden, da nur bei diesen der jeweilige Sequenzbereich bekannt war. Da *lacc2* in der cbs4-Region ein Intron enthält, erhöht sich die Fehleranzahl von 2 auf 5. Das Vorhandensein eines Intron in einer cbs-Region wurde bereits mehrfach beschrieben, so z. B. für *Agaricus bisporus* (Perry *et al.*, 1993) oder *Pleurotus ostreatus* (Giardina *et al.*, 1995). Für *lacc1* liegt die Fehleranzahl mit 2 jedoch sehr niedrig, so dass sich die fehlende Amplifikation nur mit dem hohen GC-Gehalt der DNA erklären lässt. Um zu überprüfen, ob der hohe GC-Gehalt die Amplifikation von laccase-spezifischen Fragmenten verhindert hatte, wurde eine PCR mit den vielversprechenden Primerkombinationen cbs1B/3, cbs1B/4 und cbs2/4 und dem Advantage-GC Genomic PCR Kit durchgeführt. Hierbei wurden für alle Primerkombinationen Amplifikate der erwarteten Größen erhalten (Abb. 66). Der Grund für das Fehlschlagen der Amplifikation mittels *Taq*-Polymerase war folglich der hohe GC-Gehalt der DNA.

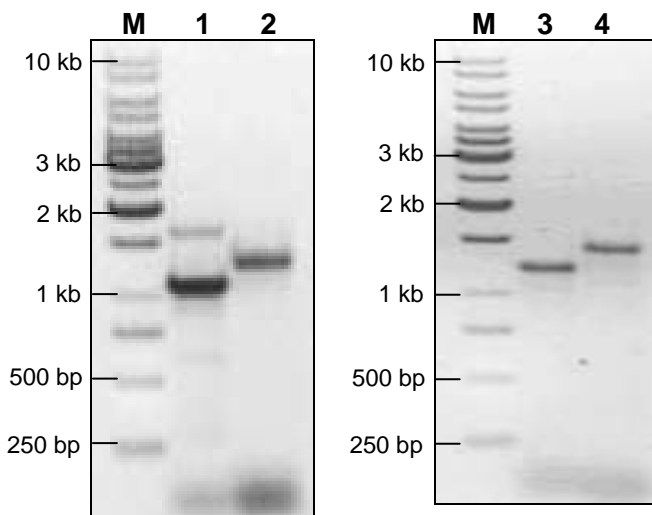


Abb. 66: Abhängigkeit der PCR vom GC-Gehalt der verwendeten DNA. Die PCR wurde auf genomischer DNA unter Verwendung des Advantage-GC Genomic PCR Kits durchgeführt. Primerkombinationen waren cbs2/3 (1, als Kontrolle), cbs2/4 (2), cbs1B/3 und cbs1B/4. Die Anlagerungstemperatur betrug 62 °C für cbs2/3, 60 °C für cbs2/4 und 58 °C für cbs1B/3 und cbs1B/4. M = Marker (Invertierte Darstellung, Banden dunkel).

Manche Primer, vor allem der Primer cbs3 lieferten auch in der Einzelprimerkontrolle Amplifikate, was darauf schließen ließ, dass für diesen Primer mehr als eine Bindestelle existiert. Da sich die Sequenzen der Kupferbinderegionen auf Grund der Histidinreste ähneln, ist es z. B. möglich, dass der Primer cbs3 unter Umständen auch an cbs2 bindet. Auch unspezifische Bindungen kamen vor, doch trotzdem lieferten die meisten Primer sinnvolle Ergebnisse, wenn die Zugabe eines zweiten spezifischen Primers die unspezifische Bindung des ersten Primers verhinderte.

4.3 Isolierung der vollständigen Laccasegene

An Hand von Sequenzanalysen konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den amplifizierten Fragmenten in der Tat um Laccasegenfragmente handelte (siehe 3.2.5.2). Der nächste Schritt war nun, die Sequenz der vollständigen Gene zu ermitteln. Dies geschah ausgehend von genomischer DNA, da diese Sequenzen zusätzlich zu kodierenden Sequenzen auch Introns und nicht-transkribierte Sequenzbereiche enthalten, deren Analyse aufschlussreich zu sein versprach. Ausgehend von den erhaltenen Sequenzen auf genomischer DNA können dann in weiterführenden Arbeiten die cDNA-Sequenzen ermittelt werden, die zur heterologen Expression der Gene benötigt werden.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, vollständige Gene ausgehend von bekannten Teilsequenzen zu isolieren. Die am häufigsten angewandte Methode ist die Herstellung einer vollständigen oder partiellen Genbank. Wichtig für diese Methode ist, dass eine spezifische Gensonde zur Verfügung steht. Verschiedene Laccasegene wurden über diese Methode isoliert, wobei teilweise Sonden zum Einsatz kamen, die für andere Pilze als den untersuchten spezifisch waren. So benutzten z. B. Fernandez-Larrea & Stahl (1996) und Berka *et al.* (1997) eine für *Neurospora*

crassa spezifische Gensonde, um die Laccasegene von *Podospora anserina* und *Myceliophthora thermophila* aufzuspüren. Um das Laccasegen aus *N. crassa* zu isolieren, ist ebenfalls eine Genbank hergestellt worden (Germann *et al.*, 1988). Die Sonde war hier ein Restriktionsfragment des Laccasegens aus *N. crassa*. Sonden können jedoch auch durch PCR mit laccasespezifischen Primern erzeugt werden, die entweder an Hand konservierter Proteinsequenzen anderer Laccasen (Tsuji *et al.*, 2001) oder direkt an Hand von sequenzierten Proteinfragmenten der untersuchten Laccase abgeleitet werden können (Giardina *et al.*, 1995). Andere Methoden zur Isolierung von vollständigen Genen sind verschiedene Modifikationen der Polymerasekettenreaktion, darunter die inverse PCR, bei der die unbekannten Sequenzen ausgehend von bekannten Sequenzen amplifiziert werden (Temp *et al.*, 1999). Nicht zu vergessen sind kommerziell erhältliche Kits, die für die gezielte Isolierung eines Gens optimiert sind. In dieser Arbeit wurden partielle Genbanken für die Laccasegene *lacc1* und *lacc2* von *H. acidophila* hergestellt. Dieser Ansatz führte aus mehreren Gründen nicht zum Erfolg, wie unter 4.3.1 erläutert wird. Stattdessen wurden die Laccasegene über inverse PCR amplifiziert.

4.3.1 Herstellung und Durchmusterung von Genbanken

Die Herstellung von Genbanken war im Falle der Laccasegene von *H. acidophila* erfolgversprechend, da mit den bekannten Genfragmenten bereits Sonden zur Durchmusterung der Banken zur Verfügung standen. Es wurden partielle Genbanken hergestellt, da so die Zahl der zu untersuchenden Klone minimiert werden kann (Ruijsenaars & Hartmans, 2004; Mansur *et al.*, 1997). Dazu wurde in einer Southern Blot Analyse die Größe der Genfragmente ermittelt, die jeweils den bekannten Teil der Gene *lacc1* (cbs/int), *lacc2* (cbs2/int) und *lacc3* (int/cbs3) trugen, wenn die DNA mit einem bestimmten Restriktionsenzym hydrolysiert wurde. Für *lacc1* und *lacc2* erzeugten *Bam*HI und *Eco*RI DNA-Fragmente, die groß genug waren, um die vollständigen Gene tragen (über 2 kb), aber auch klein genug, um kloniert werden zu können (unter 10 kb). Da die Sonde int/cbs3 keine Fragmente spezifisch markierte und zu diesem Zeitpunkt ohnehin davon ausgegangen wurde, dass cbs2/int und int/cbs3 Fragmente eines Gens sind, wurde die Herstellung von Genbanken auf *lacc1* und *lacc2* beschränkt.

Über PCR konnte nachgewiesen werden, dass die aus dem Gel eluierten Fragmente die Laccasegenfragmente trugen. Diese konnten nach Klonierung in einen geeigneten Vektor in *E. coli*-Zellen transformiert werden, wobei nicht jede Art kompetenter Zellen in der Lage war, nach Aufnahme der Plasmide zu wachsen. Wurden die Bakterien mit einem vereinfachten Protokoll kompetent gemacht, konnten sie Kontroll-DNA ohne Probleme aufnehmen, wuchsen jedoch kaum nach Aufnahme von Plasmiden, die DNA von *H. acidophila* enthielten. Mit einer

anderen Methode kompetent gemachte Zellen zeigten diese Wachstumsprobleme nicht. Schlechtes Wachstum von Klonen, die Fremd-DNA in Plasmiden tragen, kann auf für *E. coli* toxische Genprodukte zurückzuführen sein, die unter Einwirkung des *lac*-Promotors entstehen (Jana & Deb, 2005). Zudem kann die Proteinbiosynthesemaschinerie von *E. coli* ins Stocken kommen, wenn die aufgenommenen Genfragmente andere Codons zur Kodierung der Aminosäuren besitzen (Tab. 16). Warum davon nur eine Art kompetenter Zellen betroffen war, ist unklar, doch möglicherweise waren diese Zellen bereits durch das verwendete Verfahren zum Kompetentmachen vorgeschädigt und dadurch empfindlicher.

Die Durchmusterung der Genbanken erfolgte an Hand einer Koloniehybridisierung mit den bereits in der Southern Blot Analyse verwendeten Sonden, deren Spezifität zuvor überprüft wurde (Abb. 36). Dabei zeigte sich, dass die Sonde cbs2/int auch das Fragment cbs2/3 schwach erkennen konnte, wie nach den Ergebnissen der „Nested PCR“ zu erwarten war. Als Negativkontrolle wurden das Plasmid alleine und die DNA des Wirtstammes eingesetzt, welche beide nicht oder nur sehr schwach erkannt wurden.

Koloniehybridisierung von *lacc1*

Obwohl die Sonde cbs2/3 in der Koloniehybridisierung mit mehreren Klonen hybridisierte, wurden aus den entsprechenden Plasmiden jeweils mehrere Fragmente herausgeschnitten, die wesentlich kleiner waren als die ursprünglich klonierten Fragmente. Die Fragmente sollten jedoch keine Schnittstelle mehr für das jeweilige Enzym aufweisen, da sie mit eben diesem Restriktionsenzym erzeugt worden waren. Das Enzym *EcoRI* ist dafür bekannt, dass es bei hoher Konzentration oder langer Inkubationsdauer sogenannte „Star“-Aktivität aufweist, d. h. an anderen Stellen als den eigentlichen Schnittstellen schneidet. Dies wurde jedoch experimentell ausgeschlossen. Eine weitere Hypothese zur Erklärung dieses Phänomens könnte die Anwesenheit von Histonen auf den untersuchten DNA-Abschnitten sein. Histone können die DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme stören, wodurch möglicherweise die DNA vor der Southern Blot Analyse und vor der Herstellung der DNA-Banken nicht vollständig gespalten wurde. Nach der Gelelution lägen dann weitere Schnittstellen frei vor. Bei vorheriger Verwendung von Proteinase K zur Entfernung von Histonen wiesen die Restriktionsfragmente in der Southern Blot Analyse jedoch die gleiche Größe auf, wie bei Verwendung von unbehandelter DNA (nicht gezeigt). Eine Hydrolyse der Eluate E2i und E23 durch Inkubation mit *EcoRI* konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Da sich bei Verwendung eines anderen Vektors das gleiche Bild ergab und die aus den Plasmiden herausgeschnittenen kleinen Fragmente in der Southern Blot Analyse sämtlich negativ waren, lässt sich schließen, dass

unspezifische, zu kleine Fragmente in die Plasmide kloniert wurden. Bei der Auftrennung von restriktionsgespaltener DNA in hoher Konzentration im Agarosegel können kleine Fragmente weiter oben im Gel hängen bleiben, wenn sich dort große Fragmente bereits angelagert haben und den Weg versperren. Diese kleinen Fragmente waren möglicherweise in den Eluatn enthalten und wurden dann auf Grund ihrer geringen Größe bevorzugt kloniert.

Koloniehybridisierung von *lacc2*

Obwohl die Southern Blot Analyse gezeigt hatte, dass die Sonde *cbs2/int* spezifisch an DNA von *H. acidophila* band, hybridisierte diese in der Koloniehybridisierung relativ unspezifisch. Die meisten positiven Klone waren in der anschließenden PCR negativ. Zudem wurde auf dem Vektor alleine mit der Primerkombination *cbs2/int* bereits ein 450 bp großes Fragment amplifiziert, so dass die PCR nur sinnvoll war, wenn die Inserts ohne Vektorrückgrad eingesetzt wurden. Das Insert eines Klons, der in der Koloniehybridisierung und in der PCR positiv war, wurde sequenziert, nachdem die 450-bp-Bande, die bei Überprüfung des Inserts mit *cbs2/int*-Primern erhalten worden war, in ihrer Sequenz mit der Sonde übereinstimmte. Die vollständige Sequenz des Inserts wies jedoch keine Ähnlichkeit zu Laccasegenen auf und enthielt auch nicht die Sondensequenz. Nach Überprüfung von PCR und Plasmid wurde die Sequenzierung wiederholt, jedoch mit dem gleichen Ergebnis. Eine Sequenzierung des Inserts ausgehend von der Sondensequenz scheiterte und bestätigte ebenso wie eine Southern Blot Analyse, dass das Insert die Sondensequenz nicht enthielt. Die Tatsache, dass die PCR auf dem Insert das richtige Fragment amplifiziert hatte, lässt sich nur erklären, wenn man davon ausgeht, dass das sequenzierte Plasmid ein Gemisch aus zwei Plasmiden war. Dies hätte zwar bei der Sequenzierung auffallen müssen, doch enthielt die Plasmidlösung möglicherweise das gesuchte Plasmid in Spuren, so dass es bei der Sequenzierung nicht auffiel, jedoch als Matrize für die PCR ausreichte.

Durchmusterung der Genbanken über ein Plattenscreening

Ein ABTS-Plattenscreening zur Auffindung von Laccasegen tragenden Bakterien wäre wesentlich einfacher durchzuführen als die Koloniehybridisierung. Es war jedoch nicht möglich, ein solches System zur Durchmusterung der Genbanken zu etablieren. Um ABTS in den Platten zu oxidieren, müssen funktionsfähige Laccasen in *E. coli* exprimiert werden. Hierzu müsste ein Expressionsvektor verwendet werden, und die klonierten Fragmente müssen ein vollständiges Laccasegen tragen. Zudem dürften die Gene keine Introns besitzen oder zumindest keine, die den Leserahmen verändern, was jedoch bei den Genen *lacc1*, *lacc2* und *lacc3* der Fall war, wie die spätere Sequenzanalyse zeigte. Dieses Problem könnte durch

Verwendung von cDNA statt genomischer DNA für die Herstellung der Genbanken umgangen werden. Ein weiteres Problem ist, dass Laccasen meist glykosyliert vorliegen und diese Glykosylierung in *E. coli* nicht erfolgen kann. Zwar ist inzwischen bekannt, dass selbst in Bakterien N-Glykosylierungen statt finden können (Nita-Lazar *et al.*, 2005), doch ist es ein bekanntes Problem, dass eukaryontische Proteine häufig in *E. coli* nicht korrekt glykosyliert werden (Bulter *et al.*, 2003). Da die Glykosylierung jedoch wahrscheinlich für die Stabilität der Laccasen in extrazellulärer Umgebung wichtiger ist als für die Aktivität, könnte es möglich sein, dass in *E. coli* synthetisierte Laccasen katalytisch aktiv sind. Zudem muss ausgeschlossen werden, dass *E. coli* selbst eine Laccase oder eine andere extrazelluläre Oxidase produziert. Die Produktion solcher Enzyme von Bakterien und auch *E. coli* ist bereits nachgewiesen (Fernandez *et al.*, 1999; Ruijsenaars & Hartmans, 2004), und auf ABTS-haltigem Komplexmedium waren die Kolonien von *E. coli* braun-violett gefärbt. Dies weist stark auf die Anwesenheit einer extrazellulären Oxidase hin. Die Wahl eines anderen Stammes könnte hier eventuell Abhilfe leisten.

Zum Scheitern des Ansatzes führte letztlich das Problem, dass ABTS-Oxidation nur auf Minimalmedium deutlich genug zu sehen war, um für ein Screening geeignet zu sein, während *E. coli* auf Minimalmedium kaum wuchs. Zudem erfolgte die Oxidation nur bei pH-Werten bis 5,5 (Abb. 39). Selbst auf Komplexmedium wuchs *E. coli* nur bis pH 6. Das Anlegen der DNA-Bank in einem Pilz als Wirt würde zwar diese Probleme umgehen, doch kommen hier andere Nachteile zum Tragen, wie z. B. das langsame Wachstum der meisten Pilze im Vergleich zu *E. coli* und ihre schlechte Transformierbarkeit (Ruiz-Díez, 2002).

Nach Abschluss dieser Arbeiten stand fest, dass sich die Herstellung von Genbanken zur Isolierung der Laccasegene von *H. acidophila* nicht eignete. Es hätte eine hohe Anzahl an Klonen durchmustert werden müssen, was mit den vorgestellten Methoden nicht möglich war. So wurden z. B. zur Auffindung eines Gens aus *P. ostreatus* 180.000 Klone untersucht (Giardina *et al.*, 1995). Dies ist nur mittels Koloniehybridisierung möglich, die sich jedoch mit den laccasespezifischen Sonden wenig verlässlich zeigte, und deren Spezifität trotz Erhöhung der Stringenz nicht verbessert werden konnte. Auch eine Durchmusterung mittels PCR war auf Grund des unspezifischen, 450 bp großen Amplifikats schwierig.

4.3.2 Amplifikation der Laccasegene mittels inverser PCR

Nachdem die Isolierung der Laccasegene durch die Herstellung von Genbanken nicht möglich war, wurde die inverse PCR verwendet, um die flankierenden Sequenzabschnitte der

Fragmente cbs2/int (*lacc2*), cbs2/3 (*lacc1*), int/cbs3 (*lacc3*) und cbs1/2 (*lacc4*) zu amplifizieren. Mit dieser Methode können selbst DNA-Abschnitte isoliert werden, die sich nicht klonieren lassen (Silver & Keerikatte, 1989), wie dies z. B. bei den Restriktionsfragmenten B23 und E23 der Fall war. Die Sequenzen von *lacc1* und *lacc2* wurden über diese Methode vollständig erhalten, die von *lacc3* und *lacc4* teilweise.

In einem ersten Ansatz wurde die inverse PCR mit den bereits zur Herstellung der Genbanken verwendeten Eluaten durchgeführt, da bei diesen Eluaten sicher war, dass sie die gewünschten Fragmente enthalten (Abb. 35) und auch die Größe der zu erwartenden PCR-Produkte aus den Ergebnissen der Southern Blot Analyse abgeleitet werden konnte (Tab. 15). Zudem wurden die bereits zum Nachweis der Laccasegene verwendeten cbs- und int-Primer für die inverse PCR verwendet. Diese Versuche führten nicht zum Erfolg. Wahrscheinlich war die DNA-Konzentration in den Eluaten für die PCR zu gering, da bei den verschiedenen Fällungsschritten zusätzlich DNA verloren ging. Die amplifizierten Fragmente geringen Molekulargewichts stammten vermutlich von Primermultimeren, wie sie in der PCR häufig entstehen, wenn keine spezifische Matrize vorliegt (Silver & Keerikatte, 1989). Die Verwendung von vollständigen Restriktionsansätzen ohne vorherige Gelelution führte dagegen zur Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenzen, wenn direkt von den bekannten Sequenzabschnitten abgeleitete Primer verwendet wurden. Dies zeigte, dass die PCR sensitiv genug war, um die Matrize in geringer Konzentration innerhalb der Restriktionsansätze zu erkennen, sofern die Gesamt-DNA-Konzentration in den Ansätzen hoch genug war. Die cbs- und int-Primer lieferten wahrscheinlich keine Ergebnisse, da sie nicht vollständig mit den entsprechenden Regionen der Gene übereinstimmten (Tab. 22).

Der Erfolg der inversen PCR hing zudem mit der Wahl der Restriktionsenzyme zusammen. Nur für die in der Southern Blot Analyse verwendeten Enzyme *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Xho*I war die zu erwartende Fragmentgröße bekannt. Bei Verwendung anderer Enzyme konnten theoretisch Fragmente entstehen, die so groß waren, dass die Amplifikation in der PCR unmöglich wurde. Es wurden deshalb nur solche Restriktionsenzyme verwendet, die die DNA vollständig hydrolysierten, was an der gleichmäßigen Verteilung der Restriktionsfragmente im Gel nachweisbar war. Eine Ausnahme war das Enzym *Eco*RI, da die Größe der durch dieses Enzym erzeugten Laccasegentragenden Fragmente aus der Southern Blot Analyse bekannt war. Ein weiteres Problem war der hohe GC-Gehalt der Laccasegene von *H. acidophila*, der bei 60 % liegt, wie später festgestellt wurde. Auf Grund der starken Bindung zwischen den Basen G und C ist diese DNA sehr stabil und kann schlecht aufgeschmolzen werden. Zudem können sich stabile Sekundärstrukturen bilden. Dies

erschwert die PCR und kann dazu führen, dass es trotz spezifischer Primer zu keiner Amplifikation kommt (Chenchik *et al.*, 1996). Deshalb wurden verschiedene PCR-Systeme verwendet, darunter solche spezifisch für DNA mit hohen GC-Werten. Zusätzlich zur *Taq*-Polymerase, die einige der laccasegenspezifischen Fragmente amplifizieren konnte, lieferte ausschließlich das Enzymgemisch des Advantage-GC Genomic PCR Kits mit einem speziellen Zusatz zum Aufschmelzen von stabiler, GC-reicher DNA laccasegenspezifische Fragmente.

Generell lässt sich sagen, dass die inverse PCR fehleranfällig und deshalb am erfolgreichsten war, wenn das Protokoll so wenig Teilschritte wie möglich enthielt. Dies kommt vermutlich daher, dass bei jeder zusätzlichen Fällung DNA verloren geht. Nur die Fällung nach der Ligation war für den Erfolg notwendig, um die Ligase zu entfernen und vor allem um die DNA-Konzentration zu erhöhen, da diese für die Selbstligation besonders niedrig eingestellt werden muss. Wenn der Ligationsansatz ohne Fällung verwendet wird, muss auf Grund der geringen Konzentration eine größere Menge des Ansatzes zum PCR-Ansatz gegeben werden, wodurch auch eine größere Menge des Ligasepuffers mit möglicherweise störenden Inhaltsstoffen in die PCR eingebracht wird. In manchen Fällen kam es auch ohne Fällung zur Amplifikation, doch bei fehleranfälligen PCR-Reaktionen, z. B. bei der Amplifikation sehr großer Fragmente, war dies nicht der Fall.

Wurde die ringförmige DNA durch eine zweite Restriktionsspaltung linearisiert, konnten nur noch inverse Primer zur Amplifikation beitragen. Die Linearisierung soll die PCR vereinfachen (Arendse *et al.*, 1999), doch wurde beobachtet, dass es nach Linearisierung häufig zu überhaupt keiner Amplifikation kam, was jedoch auch mit der anschließenden Fällung zusammenhängen kann. Auch gibt es keinen Grund, warum es auf ringförmiger DNA zu keiner Amplifikation kommen sollte, da auch auf Plasmiden PCR durchgeführt werden kann. Möglicherweise ist die Linearisierung nötig, wenn es sich um sehr kleine DNA-Fragmente handelt, die als ringförmiges Molekül eine zu große Krümmung aufweisen, als dass die Polymerase daran entlang laufen könnte. Die spezifischen Fragmente wiesen jedoch eine Spanne von nur 400 bp bis circa 8 kb auf und wurden alle ohne vorherige Linearisierung amplifiziert. Der Einsatz der Kinase machte nur bei Verwendung von aus dem Gel eluierten Fragmenten einen Sinn, da bei der Gelelution die für die Ligation notwendigen Phosphatreste am 5'-Ende verloren gehen können, doch war hierbei kein positiver Effekt zu verzeichnen.

In allen PCR-Ansätzen wurde durch Kontroll-PCR DNA nachgewiesen, auch wenn es nicht zu spezifischen Amplifikationen mit den inversen Primern kam. Die Fehlerquelle lag also entweder in der PCR-Reaktion selbst oder in der Ligation. Die GC-reichen Fragmente sind

schwer zu amplifizieren, vor allem wenn wenig Matrize vorliegt, große Fragmente amplifiziert werden sollen (die in der Kontroll-PCR amplifizierten Fragmente waren höchstens 1 kb groß) und zusätzlich störende Ionen durch andere Puffer mit in den Ansatz gelangen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Amplifikation schwächer wird, je größer die amplifizierten Fragmente sind. Ein weiterer kritischer Punkt ist die intramolekulare Ligation, die kaum beeinflusst und nicht überprüft werden kann. Bei diesem Schritt kommt es häufig zu unspezifischen Verknüpfungen, vor allem wenn die DNA-Konzentration in den Ligaseansätzen zu hoch ist (Rosenthal & Jones, 1990). Trotz dieser Probleme lieferte die inverse PCR die vollständigen Sequenzen von *lacc1* und *lacc2* und Teilsequenzen von *lacc3* und *lacc4*, welche durch Primer-Walking sequenziert wurden.

4.4 Sequenzanalyse der Laccasegene und der hypothetischen Laccasen

Die über inverse PCR erhaltenen Sequenzen wurden zuerst daraufhin überprüft, ob es sich tatsächlich um Laccasegene handelt. Es wurde kontrolliert, ob die Kupferbinderegionen an den erwarteten Stellen aufzufinden waren. Anschließend wurden die Introns mit Hilfe von Sequenzvergleichen und der GT-AG-Regel aus den Genen entfernt, Start- und Stopcodons festgelegt und diese Gene mittels Computeranalyse in eine hypothetische Proteinsequenz umgeschrieben. Dieses Umschreiben an Hand der genomischen DNA-Sequenz ist durchaus gängig (Mikuni & Morohoshi, 1997, d'Souza *et al.*, 1996; Kwon & Anderson, 2002), doch muss bedacht werden, dass die Lage eines Introns nur mit Sicherheit bestimmt werden kann, wenn die Gensequenzen auf cDNA und genomischer DNA miteinander verglichen werden. Deshalb sind die abgeleiteten Proteinsequenzen bis zur erfolgreichen Durchführung dieser Versuche als vorläufig zu betrachten. Sowohl Gensequenzen als auch Proteinsequenzen wurden in Hinsicht auf verschiedene Sequenzparameter wie GC-Gehalt, Glykosylierungsstellen, Signalsequenzen und Aminosäurezusammensetzung untersucht. Zudem wurden die Sequenzen der hypothetischen Laccasen von *H. acidophila* mit anderen Laccasen verglichen.

4.4.1 Eigenschaften der Laccasegene

Die Sequenzen von *lacc1* und *lacc2* sowie die Genfragmente *lacc3* und *lacc4* wurden auf Grund der Anwesenheit und der Lage ihrer Kupferbindesequenzen als Laccasegene erkannt. Ein Abgleich mit anderen Laccasegenen auf DNA-Ebene war nicht möglich, da die Sequenzunterschiede zu groß für einen sinnvollen Vergleich waren. Bedenkt man, dass die Homologien zu anderen Laccasen schon auf Proteinebene nur circa 40 % Identität betrugen und die

meisten Aminosäuren wiederum von mehreren Codons kodiert werden können, wird deutlich, dass die DNA-Sequenzen erheblich stärker voneinander abweichen als die Proteinsequenzen. Auf Proteinebene waren dagegen Sequenzvergleiche möglich (4.4.3), an Hand derer die Start- und Stopcodons der Gene festgelegt wurden. Anschließend konnten Eigenschaften der Gene wie Basenzusammensetzung und die Verwendung von alternativen Codons (Codon Usage) untersucht werden. Zudem wurden die nichtkodierenden Bereiche am 5'- und 3'-Ende der Gene auf regulatorische Strukturen hin untersucht.

Festlegung der kodierenden Genbereiche

Die Start- und Stopcodons konnten nur für *lacc1* und *lacc2* festgelegt werden, da die entsprechenden Regionen von *lacc3* und *lacc4* nicht bekannt sind. Um die Startcodons festzulegen, wurden alle ATG-Codons stromaufwärts der *cbs1*-Region untersucht. Nach Knippers (1997) können auch die Codons TTG und GTG als Startcodons dienen, doch ist dies selten und überwiegend für Prokaryonten beschrieben. Es wurde überprüft, ob die hypothetischen Startcodons im gleichen Leserahmen liegen wie *cbs1* und wie groß der Abstand zu diesem ist. Zudem wurde die Aminosäuresequenz der angrenzenden Codons bestimmt, um zu untersuchen, ob sich in diesem Bereich eine Signalsequenz für den Proteinexport befindet. Als letztes Kriterium wurde die Sequenz stromaufwärts des hypothetischen Startcodons daraufhin untersucht, ob Promotorelemente aufzufinden waren. Nach Qin *et al.* (2004) werden im 5'-untranslatierten Bereich ATG-Codons unterdrückt, so dass nur wenige als Startcodon zur Verfügung stehende ATG-Codons in diesem Bereich vorhanden sind.

Für *lacc1* wurden sechs auf Grund ihrer Lage in Frage kommende Startcodons untersucht. Nur eines dieser Startcodons erfüllte folgende Kriterien: Es liegt im Leserahmen mit *cbs1* und mit 145 Aminosäuren (AS) in einem geeigneten Abstand zu diesem. Die meisten untersuchten Laccasegene aus Ascomyceten weisen zwischen dem Startcodon und *cbs1* etwa 120 AS auf (Tab. 24). Der Leserahmen zwischen dem Startcodon und *cbs1* kann sich zwar durch ein Intron verschieben, doch sind Introns vor *cbs1* scheinbar nicht häufig. Dass sie vorkommen können, zeigt u. a. das *yA*-Gen von *Aspergillus nidulans* (Aramayo & Timberlake, 1990). Vor dem gewählten Startcodon von *lacc1* liegen einige hypothetische Promotorelemente und im Anschluss an das Startcodon wurde eine mögliche Signalsequenz gefunden. Die Anwesenheit einer Signalsequenz hinter diesem Startcodon ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es sich um ein Startcodon handelt (Garavaglia *et al.*, 2004). Ein Stopcodon wurde ebenfalls in einem geeigneten Abstand zu *cbs4* von 41 AS gefunden. Zudem sind die letzten vier Aminosäuren von *Lacc1* stark konserviert (Abb. 67). Dieses Sequenzmotiv kommt bei vielen ascomycetischen Laccasen

vor und ist eine Spaltungsstelle, an der bei manchen Laccasen der C-Terminus abgespalten wird (Hakulinen *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass dieses Motiv sogar bei einigen Laccasen konserviert ist, bei denen der C-Terminus nicht abgespalten wird, weist daraufhin, dass der C-Terminus eine wichtige Funktion wahrnehmen könnte (Kiiskinen & Saloheimo, 2004). Das Sequenzmotiv liegt direkt vor dem Stopcodon wie dies auch bei Lacc1 der Fall ist (Abb. 51).

Organismen	AS vor cbs1	AS nach cbs4
<i>G. graminis</i>	128	50
<i>C. lagenarium</i>	126	49
<i>C. parasitica</i>	126	51
<i>P. anserina</i>	143	50 (+ 16)
<i>N. crassa</i>	144	51 (+ 13)
<i>M. albomyces</i>	142	51 (+ 14)
<i>B. fuckeliana</i>	118	50
<i>A. nidulans</i>	81	/

Tab. 24: Abstand von Start- und Stop-codons zu cbs1 und cbs4. Angegeben ist die Anzahl der Aminosäuren (AS), die vor cbs1 und nach cbs4 der Laccasen aus den aufgelisteten Pilzen liegen. Die Sequenzen der Laccasen von *P. anserina*, *N. crassa* und *M. albomyces* setzen sich nach dem DSGL-Motiv (Abb. 67) fort. Hier erfolgt eine enzymatische Abspaltung des C-Terminus (Zahlen in Klammern, graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Der Beginn von *lacc2* war schwieriger auszumachen. Das Startcodon, welches als hypothetischer Start gewählt wurde, liegt im gleichen Leserahmen wie cbs1 und weist stromaufwärts einige hypothetische Promotorelemente auf. Es ist jedoch nur 41 AS von cbs1 entfernt und stromabwärts befindet sich keine Signalsequenz. Ein weiteres Startcodon, das auf Grund der stromabwärtsliegenden Signalsequenz in Erwägung gezogen wurde, liegt circa 1100 bp und damit fast 300 AS vor cbs1. Während andere Laccasen mit kürzeren N-Termini in der Datenbank zu finden sind (*A. nidulans* mit 81 AS vor cbs1), wurde noch kein Gen mit 300 AS zwischen dem Startcodon und cbs1 beschrieben. Zudem müsste dieser Abschnitt mindestens ein Intron tragen, da das Startcodon nicht mit cbs1 im Leserahmen liegt. Da die meisten Introns in Laccasegenen eine Länge von zwischen 40 bp und 220 bp aufweisen (Aramayo & Timberlake, 1990; Choi *et al.*, 1992), ist die Existenz eines so großen Introns jedoch nicht wahrscheinlich. Da die N-Termini der Laccasegene nicht konserviert sind (Chefetz *et al.*, 1998), kann die Lage eines solchen Introns auch nicht an Hand der genomischen DNA-Sequenz ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde das näher an cbs1 liegende ATG als Startcodon für das Umschreiben der DNA- in die Proteinsequenz ausgewählt. Das alternative Startcodon wurde jedoch ebenfalls hinsichtlich des Vorkommens einer Signalsequenz und von Promotorstrukturen untersucht. Die an dieses Startcodon anschließende Region kann ebenfalls zur Ableitung von Primern für die PCR auf cDNA verwendet werden (siehe 4.6). Das Stopcodon von *lacc2* liegt 51 AS hinter cbs4. Es ist zu dem DSGL-Motiv homolog, jedoch nicht so stark wie das von *lacc1* (Abb. 67).

<i>Colletotrichum lagenarium</i>	D S G L
<i>Podospora anserina</i>	D S G L
<i>Neurospora crassa</i>	D S G I
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	D S G I
<i>Cryphonectria parasitica</i>	D S G V
Lacc1	D S G L
Lacc2	G S G G

Abb. 67: Konservierte C-Termini von ascomycetischen Laccasen. Das dargestellte DSGL-Motiv ist bei vielen ascomycetischen Laccasen vorhanden. Es kann als Spaltungsstelle für eine posttranslationale Modifikation des C-Terminus dienen oder am Ende der Sequenz direkt vor dem Stopcodon liegen. Es sind nur einige der Laccasen vorgestellt, die dieses Motiv tragen.

Die Lage der Introns wurde ebenfalls mit Hilfe von Sequenzvergleichen festgelegt, wobei diese jeweils so postuliert wurde, dass möglichst wenige und kurze Introns ausreichen, um Stopcodons zu entfernen und der GT-AG-Regel (Mironov & Gelfand, 2004) zu genügen. Die Lage von Introns in basidiomycetischen Genen ist im Gegensatz zu ascomycetischen Laccasegenen sehr konserviert (Fernandez-Larrea & Stahl, 1996). Interessant ist deshalb, dass die Lage der Introns innerhalb der Laccasegene von *H. acidophila* zumindest teilweise konserviert zu sein scheint. Das *lacc1*-Gen besitzt zwei seiner drei hypothetischen Introns zwischen cbs2 und int und eines hinter cbs4. Das *lacc2*-Gen besitzt nur zwei Introns, die beide hinter cbs4 liegen. Das Fragment des *lacc3*-Gens weist ebenfalls ein Intron zwischen cbs2 und int auf. Das Fragment *lacc4* weist keine Introns auf, doch ist die Sequenz ab cbs2 noch unbekannt. Bei dieser Analyse muss berücksichtigt werden, dass bei der Amplifikation der Gene aufgetretene Fehler die Festlegung der Intron Grenzen beeinflussen können, wenn dadurch falsche Stopcodons entstehen oder die Fehler in den konservierten GT-AG-Sequenzmotiven liegen. Insgesamt ist dies jedoch unwahrscheinlich, da bei Annotation eines falschen Introns mit großer Wahrscheinlichkeit die gesamte nachfolgende Sequenz verändert worden wäre. An zwei Stellen wurden Fehler in der Sequenz (u. a. ein falsches Stopcodon) bei der Analyse gefunden und mit Hilfe von PCR mit Kontrollprimern (Abb. 51 und 54) korrigiert. Das Auffinden dieser Fehler zeigte, dass es möglich ist, die Lage von Introns über Sequenzvergleiche sehr genau zu ermitteln. Problematisch ist allerdings, dass Introns außer den konservierten GT-AG-Resten zu Beginn und am Ende nur wenige konservierte Sequenzmerkmale besitzen (Mironov & Gelfand, 2004). Es gibt zwar weitere Konsensussequenzen direkt vor und nach einem Intron, doch sind diese nur schwach konserviert und schon bei gut untersuchten Organismen gibt es viele Introns, die diesen Regel nicht folgen (Knippers, 1997). Sie wurden deshalb nicht in die Analyse der Laccasegene von *H. acidophila* einbezogen, da über die Genstruktur von *H. acidophila* noch nichts bekannt ist.

Die Größe von Introns variiert im Allgemeinen zwischen 40 bp und 125 bp (Deutsch & Long, 1999), wobei die kleinsten beschriebenen Introns 18-21 bp groß sind. Bei der Untersuchung der Intron-Struktur von *Aspergillus spec.* zeigte sich, dass das durchschnittliche Gen 2 Introns

pro 1 kb kodierende Sequenz enthielt und diese Introns im Durchschnitt 40-75 bp groß waren (Deutsch & Long, 1999). Bei beschriebenen Laccasegenen aus Pilzen variiert die Introngröße von circa 40-220 bp (Choi *et al.*, 1992). Die Introns von *H. acidophila* liegen mit 24-141 bp Länge und 2-3 Introns pro 2 kb im wesentlichen in diesem Bereich. Während basidiomycetische Laccasegene häufig viele Introns enthalten, variiert die Anzahl an Introns bei ascomycetischen Laccasegenen im Bereich von 1-12 (Tab. 25), wobei die meisten Laccasegene 1-5 Introns besitzen. Dagegen enthalten Laccasegene von *T. versicolor* z. B. 10 (Ong *et al.*, 1997) und 11 Introns (Mikuni & Morohoshi, 1997), von *T. villosa* 8 und 10 Introns (Yaver *et al.* 1996) und ein Gen von *P. ostreatus* sogar 19 Introns (Giardina *et al.*, 1995).

Tab. 25: Anzahl der Introns in Laccasegenen einiger Ascomyceten (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Organismus	Anzahl der Introns	Quelle
<i>N. crassa</i>	1	Germann <i>et al.</i> , 1988
<i>A. nidulans</i> TilA	2	Scherer & Fischer, 2001
<i>G. graminis</i>	2	Litvintseva & Henson, 2002
<i>F. proliferatum</i>	2-5	Kwon & Anderson, 2002
<i>C. lagenarium</i>	3	Tsuji <i>et al.</i> , 2001
<i>P. anserina</i>	0-3	Fernandez-Larrea & Stahl, 1996
<i>A. nidulans</i> yA	5	Aramayo & Timberlake, 1990
<i>M. albomyces</i>	5	Kiiskinen & Saloheimo, 2004
<i>M. thermophila</i>	6	Berka <i>et al.</i> , 1997
<i>C. parasitica</i>	12	Choi <i>et al.</i> , 1992

Abschließend soll auf die Möglichkeit eingegangen werden, dass es sich bei den untersuchten Genen von *H. acidophila* um Pseudogene handeln könnte. Diese besitzen Strukturmerkmale intakter Gene, werden jedoch nicht abgelesen oder bilden zumindest kein funktionsfähiges Genprodukt (Lewin, 1997). Sie enthalten häufig eine große Anzahl an Mutationen, die sich in Form von Stopcodons akkumulieren können. Häufig stammen sie von cDNA-Stücken ab, die ausgehend von mRNA umgeschrieben und ins Genom integriert wurden, und enthalten deshalb oft keine Introns sowie am 3'-Ende PolyA-Reste und an den Enden Sequenzwiederholungen. Keines dieser Merkmale findet sich bei den Laccasegenen von *H. acidophila*. Für *lacc1* und *lacc2* kann deshalb relativ sicher ausgeschlossen werden, dass es sich um Pseudogene handelt, da hier die vollständige Sequenz bekannt ist. Bei den bekannten Sequenzabschnitten von *lacc3* und *lacc4* deutet zwar nichts daraufhin, dass es sich um Pseudogene handeln könnte, doch muss die vollständige Sequenz vorhanden sein, damit diese Frage entschieden werden kann.

Untersuchung der nichtkodierenden 5'- und 3'-Enden der Laccasegene

Im Unterschied zu prokaryontischen Genen sind eukaryontische Gene stark reguliert. Promotorstrukturen und solche, die für den Translationsstart wichtig sind, sind deutlich schwächer konserviert als bei Prokaryonten. Verschiedene Lehrbücher widersprechen sich z. T. in der Beschreibung konservierter Regulationselementen. Um darzulegen, welche Merkmale für die Analyse der Gene *lacc1* und *lacc2* herangezogen wurden, soll eine kurze Zusammenfassung eukaryontischer Promotorstrukturen und Regulationselementen gegeben werden (Abb. 68). Die Angaben entstammen im wesentlichen Lewin (1997) und Knippers (1997).

Der Transkriptionsstartpunkt eukaryontischer Gene ist meist ein Adenin und liegt in dem so genannten Inr-Element, einer pyrimidinreichen Sequenz. Circa 29-34 bp stromaufwärts davon liegt die Hauptkomponente des Promotors, die TATA-Box, die jedoch nicht so stark konserviert ist wie die der Prokaryonten. Vor der TATA-Box (Konsensussequenz: $\text{GTAT}^{\text{A}}/\text{C}^{\text{A}}/\text{T}^{\text{A}}/\text{T}$) liegt meist eine GC-reiche Region mit GC-Boxen. Weiter stromaufwärts, 70-80 bp vom Transkriptionsstartpunkt entfernt, liegen die CAAT-Boxen, die ebenso wie die so genannten GC-Boxen in umgekehrter Orientierung und großer Anzahl auftreten können. Ein weiterer wichtiger Bereich liegt 90-100 bp stromaufwärts und enthält so genannte CACCC-Elemente. Die drei letztgenannten Regulationselemente halten nicht immer diese strenge Reihenfolge ein. Bei Haushaltsgenen fehlt meist eine TATA-Box und der Transkriptionsstartpunkt ist nicht eindeutig definiert. CAAT-Boxen fehlen häufig, während meist viele GC-Boxen vorkommen.

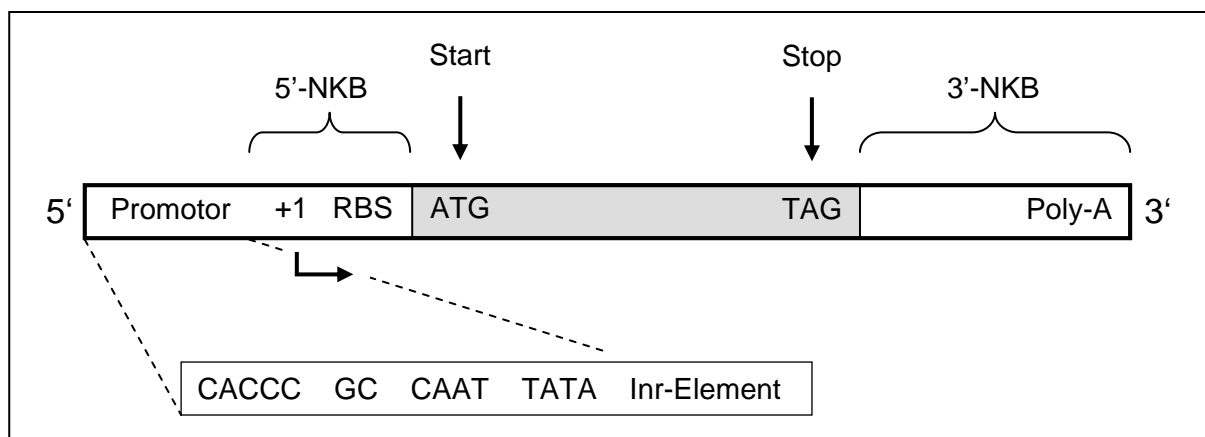


Abb. 68: Schematische Darstellung eines Gens mit Promotorbereich. Die Transkription beginnt am Transkriptionsstartpunkt (+1, rechtwinkliger Pfeil). Die gebildete mRNA besteht aus einem 5'-Nichtkodierungsbereich (5'-NKB), dem kodierenden Abschnitt des Gens und einem 3'-Nichtkodierungsbereich (3'-NKB). Am Ende des 3'-NKB, der u. a. für die Stabilität der Boten-RNA verantwortlich ist, liegt die Polyadenylierungsstelle (Poly-A). Im 5'-NKB trägt die mRNA eine Ribosomenbindestelle (RBS), die vor dem Startcodon liegt, an dem die Translation beginnt. Hinter dem Stopcodon bricht die Translation ab. Der Promotorbereich (vergrößerter Ausschnitt) trägt die TATA-Box, an der die RNA-Polymerase bindet. Dahinter liegt das Inr-Element, das den Transkriptionsstartpunkt markiert. Vor der TATA-Box befinden sich regulatorische Elemente wie CACCC-Elemente und CAAT-bzw. GC-Boxen. Diese können in größerer Stückzahl und teilweise in umgekehrter Orientierung vorkommen.

Der nichtkodierende 5'-Bereich eines Gens ist normalerweise zwischen 50-100 bp lang und enthält die Ribosomenbindestelle, die bei Eukaryoten nur schwach konserviert ist. Eine bei Lewin (1997) angegebene Konsensussequenz für diese lautet GCC^G/_ACCATG. Der 3'-nichtkodierende Bereich kann mehrere Hundert Basenpaare lang sein und ist für die Stabilität der mRNA entscheidend. Die Sequenzabschnitte ATTTA destabilisieren die mRNA.

Im 5'-nichtkodierenden Bereich von *lacc1* wurden zwei hypothetische Inr-Elemente und TATA-Boxen gefunden, von denen die näher am Startcodon liegende die wahrscheinlichere ist. Verschiedene Promotorstrukturen wie GC-Boxen, CAAT-Elemente, ein CACCC-Element und ein für pilzliche Promotoren spezifisches TGGGTT-Element (Soden & Dobson, 2003) sind nachweisbar, was dafür spricht, dass es sich bei dieser Region um den Promotorbereich des Gens handelt. Gene, deren Transkriptionsrate durch Metalle gesteigert werden kann, tragen in ihrem Promotorbereich sogenannte MRE-Elemente. Ein solches Element mit der Konsensussequenz TGCRCNC (R = A oder G, N = A, C, G oder T nach Galhaup *et al.*, 2002) ist im *lacc1*-Promotorbereich vorhanden, was auf eine kupferabhängige Induktion der Transkription hinweist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Wachstumsversuchs mit limitierter Kupferkonzentration (Abb. 14), die die Kupferabhängigkeit der sezernierten Laccase nachwiesen. Der 3'-terminale Bereich von *lacc1* weist eine Destabilisierungssequenz auf, doch konnte eine der Konsensussequenz entsprechende Polyadenylierungsstelle nicht gefunden werden. Der bekannte Bereich von circa 200 bp ist wahrscheinlich zu kurz, um diese zu enthalten.

Für das Gen *lacc2* wurden zwei mögliche 5'-nichtkodierende Bereiche untersucht, die vor den hypothetischen Startcodons lagen. Im 5'-Bereich des näher an *cbs1* liegenden Startcodons befindet sich ein hypothetisches Inr-Element mit TATA-Box, die jedoch von der Konsensussequenz abweicht. GC-Boxen, CACCC-Elemente und eine CAAT-Box sind ebenfalls vorhanden. Ein MRE-Element ist nicht nachweisbar, so dass *lacc2* möglicherweise nicht durch Kupfer induziert wird. Die Kupferabhängigkeit wurde bisher nur für die lösliche, extrazelluläre und nicht für die wahrscheinlich von *lacc2* kodierte, intrazelluläre bzw. zellassozierte Laccase nachgewiesen. Der weiter stromaufwärts liegende 5'-Bereich vor dem alternativen Startcodon enthält eine TATA-Box, die der Konsensussequenz ähnelt, sowie eine GC- und eine CAAT-Box. Zusätzlich ist ein MRE-Element nachweisbar. Ein Inr-Element wurde nicht gefunden, und das vorhandene CACCC-Element ist wahrscheinlich zu dicht vor dem Startcodon lokalisiert, um ein solches Regulationselement zu sein. Insgesamt kann an Hand dieser Daten nicht entschieden werden, welcher 5'-Bereich den Promotor von *lacc2* trägt. Die circa 200 bp des bekannten 3'-nichtkodierenden Bereichs enthalten eine Destabilisierungssequenz, jedoch ebenso wie der

Bereich von *lacc1* keine Polyadenylierungsstelle, die der Konsensussequenz entspricht. Auch bei anderen Laccasegenen wie z. B. dem von *C. lagenarium* wurde keine PolyA-Stelle gefunden (Tsuji *et al.*, 2001). Die diskutierten hypothetischen Regulationselemente weichen teilweise deutlich von den Konsensussequenzen ab. Da kaum etwas über die genomische Organisation von Vertretern der Ordnung Dothideales – nicht zu sprechen von *H. acidophila* selbst – bekannt ist, müssen Abweichungen von den Konsensussequenzen in Betracht gezogen werden. Sequenzierfehler wurden durch zwei- bis dreimaliges Sequenzieren aller Sequenzen weitgehend ausgeschlossen. Die PCR birgt jedoch Risiken, da keine Polymerase ohne Fehler arbeitet. Das verwendete Polymerase-Gemisch des Advantage-GC Genomic PCR Kits weist im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine 3'-5'-Fehlerkontrollfunktion auf und verspricht eine hohe Spezifität (BD Biosciences, Handbuch).

GC-Gehalt

Der GC-Gehalt ist ein Parameter zur Ermittlung von Verwandtschaftsverhältnissen von Organismen. Gram-positive Bakterien z. B. werden an Hand des GC-Gehalts ihrer DNA in solche mit niedrigem und solche mit hohem GC-Gehalt eingeteilt (Madigan *et al.*, 2000). Die Grenze zwischen hohem und niedrigem GC-Gehalt liegt hier bei etwa 60 %, und im Allgemeinen weisen Bakterien einen GC-Gehalt von 20-80 % auf. Bei Eukaryonten ist dieser Bereich etwas kleiner. Pilzliche DNA weist in der Regel einen GC-Gehalt von 20 % bis knapp über 60 % auf. Gene, die besonders stabil sein müssen, wie z. B. Gene von thermophilen Organismen, weisen einen höheren GC-Gehalt auf (Berka *et al.*, 1997).

Die meisten untersuchten Laccasegene weisen ebenfalls einen GC-Gehalt um die 60 % auf und liegen damit im oberen Bereich des GC-Gehalts bei Pilzen. Bei *N. crassa* liegt der GC-Gehalt bei 56,9 %, wobei er in den Exons höher liegt als in den Introns (Germann *et al.*, 1988). Codons mit G oder C am Ende werden stark bevorzugt. Bei dem thermophilen Pilz *M. thermophila* ist dieser Effekt mit 65,5 % GC-Gehalt und 90 % Codons mit G oder C an 3. Position noch stärker ausgeprägt (Berka *et al.*, 1997). Auch basidiomycetische Laccasegene können einen hohen GC-Gehalt aufweisen, so z. B. eines aus *T. versicolor* mit 63 % (Mikuni & Morohoshi, 1997). Die Laccasegene aus *H. acidophila* liegen mit Werten um 60 % in diesem Bereich. Auch hier weisen die Introns einen niedrigeren GC-Gehalt auf, und ein G oder C an 3. Position des Codons wird bevorzugt (Tab. 17 und Tab. 18). Der GC-Gehalt des Fragmentes *lacc4* ist niedriger, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass nur ein kleiner Sequenzabschnitt zur Verfügung steht. Der 5'-Bereich von *lacc1* weist ebenfalls einen niedrigeren GC-Gehalt auf als das gesamte Gen.

Verwendung alternativer Codons (Codon Usage)

Obwohl bis zu sechs Codons für eine Aminosäure kodieren können, wird meist eins dieser Codons häufiger für die Kodierung der jeweiligen Aminosäure verwendet als die anderen. Diese Vorliebe für bestimmte Codons ist zudem spezifisch für einen bestimmten Organismus. Wenn ein Gen heterolog exprimiert wird, kann es zu Problemen kommen, wenn Wirt und Donor unterschiedlichen Codons den Vorzug geben, da die Proteinbiosynthesemaschinerie auf die in dem jeweiligen Organismus vorherrschenden Bedingungen eingestellt ist (Bulter *et al.*, 2003; Jana & Deb, 2005).

Ausgehend von den Sequenzdaten der Gene *lacc1-4* konnte eine Tabelle mit den bevorzugt verwendeten Codons bei *H. acidophila* erstellt werden. Bevorzugt werden meist Codons mit G oder C am Ende. In Tabelle 26 wird die Codonpräferenz von *H. acidophila* mit den Codonpräferenzen von Organismen verglichen, die häufig als Expressionssystem verwendet werden, wobei von *H. acidophila* nur die beiden vollständig sequenzierten Gene *lacc1* und *lacc2* berücksichtigt wurden. Es zeigte sich, dass *E. coli* eine deutlich andere Codonpräferenz aufweist als *H. acidophila*. Das von der Hefe häufig zur Kodierung von Prolin verwendete Codon CCC ist eines der sechs am wenigsten verwendeten Codons bei *E. coli*. Zwei der seltensten Codons bei *S. cerevisiae* sind bei *H. acidophila* am häufigsten, CCG für Prolin und CTC für Leucin. Tabelle 26 zeigt außerdem, dass sich außer *E. coli* auch die beiden Hefen *S. cerevisiae* und *P. pastoris* auf Grund ihrer Codonpräferenzen nicht gut für die Expression von den Laccasegenen aus *H. acidophila* eignen. Die filamentösen Pilze *A. niger* und *T. atroviride* verwenden dagegen fast vollständig die gleichen bevorzugten Codons wie *H. acidophila*. Eine Expression in *S. cerevisiae* oder *P. pastoris* könnte dennoch möglich sein, wenn die Gensequenzen von *H. acidophila* vor Klonierung gezielt verändert werden (Sinclair & Choy, 2002).

Tab. 26: Bevorzugt verwendete Codons in *H. acidophila* und in einigen häufig zur heterologen Expression verwendeten Organismen. Die Angaben für *H. acidophila* beziehen sich nur auf die Gene *lacc1* und *lacc2*. Die Angaben für die anderen Pilze stammen von www.kazusa.or.jp/codon/ (Ausnahme: *S. cerevisiae*, Sinclair & Choy, 2002). Von *H. acidophila* abweichende Codons sind fett gedruckt (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

AS	<i>H. acidophila</i>	<i>E. coli</i> K12	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. atroviride</i>
Ala	GCC	GCG	GCT	GCT	GCC	GCC
Cys	TGC	TGC	TGT	TGT	TGC	TGC
Asp	GAC	GAT	GAC	GAT	GAC	GAC
Glu	GAG	GAA	GAA	GAA	GAG	GAG
Phe	TTC	TTT	TTC	TTT	TTC	TTC
Gly	GGC	GGC	GGT	GGT	GGC	GGC
His	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAC

AS	<i>H. acidophila</i>	<i>E. coli</i> K12	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. atroviride</i>
Ile	ATC	ATT	ATC/ATT	ATT	ATC	ATC
Lys	AAG	AAA	AAG	AAG	AAG	AAG
Leu	CTG/CTC	CTG	TTG	TTG	CTG	CTG
Asn	AAC	AAC	AAC	AAC	AAC	AAC
Pro	CCG/CCC	CCG	CCA	CCA	CCC	CCC
Gln	CAG	CAG	CAA	CAA	CAG	CAG
Arg	CGC	CGC	AGA	AGA	CGC	CGC
Ser	TCG	AGC	TCT/TCC	TCT	TCC	AGC
Thr	ACC	ACC	ACC/ACT	ACT	ACC	ACC
Val	GTC/GTG	GTG	GTT/GTC	GTT	GTC	GTC
Tyr	TAC	TAT	TAC	TAC	TAC	TAC

Die unterschiedliche Codonpräferenz kann auch ein Grund sein, warum die unter 2.12.1 beschriebenen Haushaltsgenprimer keine Amplifikate geliefert haben. Obwohl die Genprodukte der Haushaltsgene in allen Organismen konserviert sein sollten, weichen sie möglicherweise in der einen oder anderen Aminosäure voneinander ab. Wenn sich dann zusätzlich die Codonpräferenz von dem Organismus, der für die Ableitung der Primer verwendet wurde, von der von *H. acidophila* unterscheidet, akkumulieren sich mehrere Fehlstellen des Primers, so dass es zu keiner Bindung an die Matrize kommen kann. Die für das ATPase-Gen und GPD-Gen spezifischen Primer waren für *S. cerevisiae* etabliert. Bei diesem Organismus unterscheidet sich die Codonpräferenz stark von der von *H. acidophila*. Die Primer für das PGK-Gen wurden von den Sequenzen von *Trichoderma viride* und *T. reesei* abgeleitet (Schlosser, 2000) und sollten deshalb eigentlich zu der DNA von *H. acidophila* passen. Das β -Aktin-Gen wird häufig als Haushaltsgen verwendet (Murphy *et al.*, 2003). Die Primer für dieses Gen wurden für diese Arbeit von *Ashbya gossipii* abgeleitet, einem Pilz, dessen Codonpräferenz sich nur bei zwei Aminosäuren von der von *H. acidophila* unterscheidet. Dies könnte erklären, warum dieser Primer als einziger Haushaltsgenprimer ein Fragment aus *H. acidophila*-DNA amplifiziert hat. Dass diese Amplifikation so schwach war, liegt möglicherweise ebenso wie das Fehlschlagen der Amplifikation mit den PGK-Primern an dem hohen GC-Gehalt der DNA.

4.4.2 Eigenschaften der hypothetischen Laccasen

Nach dem Umschreiben der DNA-Sequenzen der Gene *lacc1-4* in die Proteinsequenzen wurden die daraus resultierenden hypothetischen Proteine Lacc1-4 hinsichtlich potenzieller N-Glykosylierungsstellen und N-terminaler Signalsequenzen untersucht. Außerdem wurden Kyte-Doolittle-Plots zur Analyse der Hydrophobizitätsverteilung erstellt. An Hand der

Aminosäurezusammensetzung der Proteine wurde überprüft, ob eine Anpassung an saure Umgebungsbedingungen festzustellen ist. Da bisher nicht bewiesen ist, dass die von *lacc1-4* kodierten Proteine wirklich die postulierten, funktionsfähigen Laccasen I-IV darstellen, werden die Genprodukte im Folgenden meist mit Lacc1-4 bezeichnet.

Vorhandensein potenzieller N-Glykosylierungsstellen

N-terminale Glykosylierungsstellen besitzen die Konsensussequenz N-X-T/S, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann (Nita-Lazar *et al.*, 2005). Diese Bedingung ist notwendig, jedoch nicht hinreichend für eine Anheftung von Zuckerresten an den Asparaginsäurerest. Laccasen sind in der Regel extrazelluläre Proteine mit starker Glykosylierung, die die Stabilität im extrazellulären Raum erhöht (Cai *et al.*, 2005; Jolival *et al.*, 2005). Auch auf enzymatischer Ebene gibt es Hinweise darauf, dass die Lacasen von *H. acidophila* glykosyliert sind (Bend, 2005). Die Tatsache, dass die Proteine Lacc1-4 potenzielle N-Glykosylierungsstellen besitzen, ist deshalb ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei diesen isolierten Genen um die Strukturgene der auf enzymatischer Ebene untersuchten Laccasen handelt.

Lacc1 enthält 9 potenzielle N-Glykosylierungsstellen und liegt damit im Bereich anderer untersuchter Laccasen (Tab. 27). Lacc2 enthält mit nur 2 potenziellen N-Glykosylierungsstellen auffallend wenige. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass es sich bei diesem Protein nicht um ein extrazelluläres Enzym im eigentlichen Sinne handelt, sondern um eines, welches in Vesikeln vorliegt und nur beim Export des synthetisierten Melanins mit ausgeschleust wird, wonach es möglicherweise nicht mehr aktiv sein muss. Auch in der Sequenz einer Laccase des Speisepilzes *Volvariella volvacea* finden sich nur 2 N-Glykosylierungsstellen, wenn dieser Pilz in Festphasenfermentation angezogen wird (Chen *et al.*, 2004). Die genaue Lokalisation dieser Laccase ist bisher nicht beschrieben. Bekannt ist nur, dass sich die Laccase von beschriebenen extrazellulären Laccasen aus dem gleichen Pilz unterscheidet. Nicht alle N-Glykosylierungsstellen müssen auch verwendet werden. So werden von den 9 potenziellen Stellen in der Laccase von *M. albomyces* nur 7 glykosyliert (Kiiskinen & Saloheimo, 2004). Die 5 N-Glykosylierungsstellen des Fragments von Lacc3 und die 2 des noch kürzeren Fragments von Lacc4 weisen darauf hin, dass auch diese beiden Proteine stark glykosyliert sein könnten.

Tab. 27: Anzahl der potenziellen N-Glykosylierungsstellen in Laccasen einiger Pilze. Nicht alle diese Stellen müssen im reifen Protein glykosyliert vorliegen (Graue Balken dienen der Lesbarkeit).

Organismus	N-Glykosylierungsstellen	Quelle
<i>N. crassa</i>	7	Germann <i>et al.</i> , 1988
<i>P. cinnabarinus</i>	7	Eggert <i>et al.</i> , 1998
<i>G. graminis</i>	6-8	Litvintseva & Henson, 2002
<i>S. commune</i>	6	Hatamoto <i>et al.</i> , 1999
<i>M. albomyces</i>	9	Kiiskinen & Saloheimo, 2004
<i>P. anserina</i>	10	Fernandez-Larrea & Stahl, 1996
<i>A. nidulans</i> yA	8	Aramayo & Timberlake, 1990
<i>A. bisporus</i>	5	Perry <i>et al.</i> , 1993
<i>M. thermophila</i>	11	Berka <i>et al.</i> , 1997

Vorhandensein von Signalsequenzen für den Proteinexport

In Eukaryonten werden extrazelluläre Proteine an einer Signalsequenz erkannt und ins Endoplasmatische Retikulum transportiert (Alberts *et al.*, 1994). Bei diesem Transport wird die Signalsequenz normalerweise abgeschnitten. Das Protein wird in den Golgi-Apparat weitergeleitet und dort für den Transport zur Zelloberfläche vorbereitet. N-terminale Signalsequenzen können an Hand ihrer Struktur und einer hohen Dichte an hydrophoben Aminosäureresten erkannt werden, obwohl es keine eindeutige Konsensussequenz gibt. Diese N-terminalen Signalsequenzen wurden u. a. bei sezernierten Laccasen von *M. thermophila*, *P. anserina*, *C. parasitica*, *M. albomyces*, *G. graminis* und *A. bisporus* gefunden.

Bei Laccl wurde direkt hinter dem als Startcodon gewählten ATG eine Signalsequenz gefunden, die verschwand, wenn ein späteres ATG als Startcodon gewählt wurde. Dadurch bestätigt sich, dass das richtige Startcodon zum Umschreiben der Sequenz verwendet wurde. Die hohe Wahrscheinlichkeit extrazellulär lokalisiert zu sein, passt zu der Tatsache, dass Laccl viele N-Glykosylierungsstellen aufweist und zudem ein extrazelluläres Enzym im Kulturüberstand nachgewiesen wurde. Für Lac2 konnte stromabwärts von dem zum Umschreiben der Sequenz verwendeten Startcodon keine N-terminale Signalsequenz nachgewiesen werden, und auch für andere Kompartimente spezifische Signalsequenzen fehlen. Ob jedoch für den Einschluss in melanosomenartige Organellen eine Signalsequenz benötigt wird, ist unbekannt. Die Tatsache, dass nur wenige N-Glykosylierungsstellen in Lac2 vorhanden sind, ist ein weiterer Hinweis auf eine intrazelluläre Lokalisation. Obwohl dies nicht bewiesen ist und zudem weitere Lacasegene in *H. acidophila* existieren, scheint es wahrscheinlich, dass *lacc2* für das zellassozierte Enzym kodiert. Dieses konnte nur nach Zellaufschluss isoliert werden, was dafür spricht, dass es sich um ein intrazelluläres Enzym

handelt, das wahrscheinlich nicht frei im Cytoplasma vorliegt, sondern in Melanosomen eingeschlossen ist. Hinweise darauf ergeben sich auch aus der Existenz elektronendichter Organellen in den Zellen von *H. acidophila* (Hölker *et al.*, 2004). Mit diesen Organellen könnte die Laccase über die Cytoplasmamembran nach draußen gelangen, wenn das synthetisierte Melanin (oder teilpolymerisierte Vorstufen) in die Zellwand eingebaut wird. Dies könnte erklären, warum Laccaseaktivität an den Zellen gemessen wurde, ohne dass die Zellen aufgeschlossen wurden (Abb. 13). Allerdings könnte diese Aktivität auch von Lacc1 stammen, das gerade über die Membran transportiert wird. Das Computerprogramm ProteomeP errechnet einen Wert, der eine Aussage darüber erlaubt, ob ein Protein extrazellulär vorliegt, auch wenn es keine typische N-terminale Signalsequenz besitzt. Hierbei werden Strukturmerkmale des gesamten Proteins herangezogen. Dieser Wert liegt für Lacc2 sehr hoch, was mit der vorgestellten Hypothese übereinstimmt. Allerdings muss erwähnt werden, dass für Lacc2 ein weiteres hypothetisches Startcodon mit darauf folgender Signalsequenz gefunden wurde. Handelt es sich bei diesem ATG um das Startcodon, wäre Lacc2 ein reguläres, extrazelluläres Protein, da die N-terminale Signalsequenz der entscheidende Faktor für den Export ist. Wie unter 4.4.1 diskutiert ist es jedoch unwahrscheinlich, dass dieses Startcodon das zu Lacc2 gehörige ist. Möglicherweise liegt an dieser Stelle das Startcodon eines anderen Gens.

Hydrophobizität der Laccasen

Die Hydrophobizitätsverteilung der hypothetischen Laccasen von *H. acidophila* wurde über Kyte-Doolittle-Plots analysiert. Es zeigte sich, dass alle vier Laccasen ein ähnliches Profil aufweisen, so weit die Sequenz vorhanden ist. Die Profile anderer Laccasen unterschieden sich davon, wenn sie im Kyte-Doolittle-Plot analysiert wurden. Dies zeigt, dass die Laccasen von *H. acidophila* trotz geringer Sequenzkonservierung einige übergeordnete Gemeinsamkeiten aufweisen. Der größte Teil der Proteine ist dem Profil nach hydrophil (negative Werte). Membrandomänen, die man an Werten größer als 1,6 erkennen würde, kommen nicht vor. Einige Bereiche sind deutlich hydrophob, einer davon am C-Terminus. Der C-Terminus scheint eine katalytische Funktion aufzuweisen, da er bei vielen ascomycetischen Laccasen konserviert ist (Hakulinen *et al.*, 2002). Die Signalsequenz von Lacc1 ist auffällig durch die extreme Hydrophobizität. Für Lacc2 ist das Hydrophobizitätsprofil der hypothetischen Signalsequenz stromaufwärts von Lacc2 zusätzlich zu dem Profil des gesamten Proteins gezeigt. Der Kyte-Doolittle-Plot untersucht jedoch nur die Primärstruktur des ungefalteten Proteins. Durch die Faltung gelangen hydrophobe Reste meist ins Innere während hydrophile nach außen zeigen, doch ist über diese Sekundärstruktur von Lacc1-4 bisher nichts bekannt.

Redoxpotenzial

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Analyse der Laccasen, auch im Hinblick auf eine Eignung für industrielle Prozesse, ist das Redoxpotenzial. Dieses lässt sich nur für die aufgereinigten Enzyme bestimmen, doch kann die Sequenzanalyse einen ersten Hinweis liefern. So werden Laccasen auf Grund einer Aminosäure, die mit dem Typ1-Kupfer in Verbindung steht, in drei Klassen eingeteilt (Karahanian *et al.*, 1998). Laccasen mit dem am wenigsten positiven Redoxpotenzial tragen einen Methioninrest an dieser Stelle. Dies kommt z. B. bei einer Laccase aus *A. nidulans* vor (Aramayo & Timberlake, 1990) und ist auch bei Ascorbat-oxidasen und anderen Multikupferoxidasen der Fall (Messerschmidt & Huber 1990; Kumar *et al.*, 2003). Enzyme der Klasse 2 mit elektropositiveren Redoxpotenzial als Klasse-1-Laccasen tragen einen Leucinrest und solche der Klasse 3 mit dem elektropositivsten Redoxpotenzial einen Phenylalaninrest. Lacc1 ist folglich eine Klasse-2-Laccase und Lacc2 eine Klasse-3-Laccase. Somit sollte das Redoxpotenzial zumindest von Lacc2 sehr elektropositiv sein. Je elektropositiver das Enzym gegenüber dem Substrat ist, desto besser funktioniert die Oxidation (Xu, 1996). Ein stark elektropositives Redoxpotenzial verweist deshalb auf eine gute Eignung der Enzyme zur Oxidation verschiedener Substrate. Abbildung 69 zeigt die für die Kupferbindung wichtigen Aminosäurereste der Kupferbindedomänen an Hand von Lacc1-4.

Hypothetische Genprodukte	cbs1	cbs2	cbs3	cbs4
Lacc1	HWHG	HSHY	HPMHMH	HCHIAWHNNG [L]
Lacc2	HFHG	HSHF	HP I H L H	HCHIGWHXXG [F]
Lacc3		HAHY	HP I H M H	
Lacc4	HWHG	HSHN		

Abb. 69: Für die Kupferbindung wichtige Aminosäurereste der Kupferbindedomänen. Die dargestellten Sequenzen gehörten zu Lacc1-4. Die für die Kupferbindung notwendigen Aminosäuren (bunt hinterlegt) sind bei allen Laccasen konserviert, die anderen Aminosäuren innerhalb der Kupferbindesequenzen können in Grenzen variieren. Die konservierte mit dem Typ1-Kupfer assoziierte Aminosäure, die für die Höhe des Redoxpotenzials wichtig ist, kann entweder ein M, L oder F sein (Kästchen). Typ1-assoziierte AS sind schwarz, Typ2-Kupfer-assoziierte hellgrau und Typ3-Kupfer-assoziierte grau hinterlegt.

4.4.3 Homologien und Verwandtschaftsverhältnisse

Die Genfragmente cbs2/int, cbs2/3, int/cbs3 und cbs1/2 wurden durch Sequenzvergleiche als Laccasegenfragmente bestimmt. Einzig das Fragment cbs2/3 enthielt eine der zur Primer-Ableitung verwendeten konservierten Regionen: die int-Region. Die anderen Fragmente

enthielten jeweils nur die Sequenz, die zwischen diesen konservierten Regionen lag. Zu diesem Zeitpunkt war kein für eine Kupferbindedomäne kodierender Sequenzabschnitt aus *H. acidophila* bekannt. Nach Abschluss der Arbeiten waren von jedem Gen mindestens zwei Kupferbindesequenzen bekannt, so dass sichergestellt war, dass alle Sequenzen für Kupferbindeproteine und damit wahrscheinlich für Laccasen kodieren. Die vollständigen Laccasegene wurden ebenfalls über Sequenzvergleiche analysiert, um den Konservierungsgrad der Gene und der daraus abgeleiteten Enzyme zu ermitteln.

Die hypothetischen Proteinsequenzen von Lacc1-3 wiesen die größten Homologien zu ascomycetischen Laccasen auf, Lacc4 dagegen zu basidiomycetischen Laccasen. Allerdings waren alle ermittelten Homologien recht niedrig, was im Allgemeinen für ascomycetische Laccasen gilt (Fernandez-Larrea & Stahl, 1996). Vor allem die Sequenzabschnitte zwischen den cbs-Regionen sind sehr divergierend (Kwon & Anderson, 2002). Die mittels Standard-PCR erhaltenen Laccasegenfragmente wurden analysiert, ohne mögliche Introns aus den Sequenzen zu entfernen. Ein Vergleich mit den annotierten Genen und Genfragmenten zeigt jedoch, dass die konservierten Abschnitte, die für die Sequenzanalyse der Fragmente verwendet worden waren (Abb. 29), keine Introns enthielten. Die Fragmente cbs2/3 und cbs2/int sind zu 35 % identisch, die vollständigen Proteinen Lacc1 und Lacc2 nur zu 27 %. Die Homologie von Lacc1 und Lacc3 zueinander ist dagegen mit 44 % Identität höher als die von cbs2/3 und int/3 zueinander mit nur 39 % Identität. Betrachtet man die Homologien der vier Laccasen aus *H. acidophila* zueinander, fällt auf, dass Lacc1 und Lacc3 mit 44 % Identität und 62 % Ähnlichkeit am stärksten zueinander homolog sind. Die anderen Proteine und Proteinfragmente weisen alle Identitätswerte zueinander zwischen 23 % und 28 % auf, was für Laccasen aus dem gleichen Organismus sehr gering ist. Auf Grund dieser geringen Homologie lässt sich ausschließen, dass die Proteine von Allelen des gleichen Gens kodiert werden. Im Vergleich dazu sind zwei Laccasen aus *T. villosa* zu 80 % identisch (Yaver *et al.*, 1996) und zwei aus *Agaricus bisporus* sogar zu 93 % (Perry *et al.*, 1993). Das Fragment int/cbs3 weist eine deutlich geringere Konservierung auf als die Fragmente cbs2/int und cbs2/3, so dass in Frage gestellt werden musste, ob es sich überhaupt um ein Laccasegen handelt. Da keine überlappende Sequenz zu cbs2/int existierte, war zudem unklar ob int/cbs3 und cbs2/int zu einem einzigen *lacc2*-Gen gehörte. Die vollständige Sequenz für *lacc2* zeigte, dass letzteres nicht der Fall ist. Die fast vollständige Sequenz von *lacc3* zeigte jedoch, dass auch dieses Gen für eine Laccase kodiert. Die Homologien liegen für *lacc3* im gleichen Bereich wie für alle anderen Laccasegene aus *H. acidophila*.

Die Laccasen mit den höchsten Homologien zu den Laccasen und Laccasefragmenten von *H. acidophila* gehörten überwiegend zu den gleichen Pilzen, wenn Lacc1-3 betrachtet werden. Laccasesequenzen, die nur als Teilsequenz in der Datenbank stehen, wie die von *Stagonophora spec.*, *Phaeosphaeria spartinicola*, *P. halima* und *Buergenerula spartinae* zeigen hohe Homologien zu den kurzen Laccasegenfragmenten cbs2/int, cbs2/3 und int/3, jedoch geringe Homologien zu den vollständigen bzw. fast vollständigen Sequenzen von Lacc1-3, was jedoch mit der Methode zusammenhängt, mit der diese Sequenzen verglichen werden. Die höchsten Homologien sowohl für cbs1/2 als auch für Lacc4 ergaben sich zu basidiomycetischen Laccasen. Es stellt sich die Frage, wie *H. acidophila* ein Laccasegen besitzen kann, dass basidiomycetischen Genen ähnelt, aber drei Gene die ascomycetischen Genen ähneln. Da horizontaler Gentransfer auf Prokaryonten beschränkt zu sein scheint, (Madigan *et al.*, 2000) kann ein direkter Austausch von Genen zwischen Basidiomyceten und Ascomyceten ausgeschlossen werden. Es könnten höchstens Gene über Bakterien, die als „Genfähren“ fungieren, von Pilz zu Pilz transportiert werden (Brakhage *et al.*, 2005). Möglicherweise stammt das *lacc4*-Gen aber auch aus einer Zeit vor der phylogenetischen Trennung der beiden Pilzklassen oder die Sequenzähnlichkeit kommt dadurch zustande, dass diese Laccase eine ähnliche Funktion erfüllt wie basidiomycetische Laccasen (z. B. Abbau von Braunkohle, Huminsäuren u. ä.). Andererseits ist das bekannte Fragment von Lacc4 sehr kurz, so dass mehr Sequenzinformation vielleicht andere Homologien zu Tage fördern wird.

Die insgesamt niedrigen Homologien der vier hypothetischen Laccasen und Laccasefragmente und die noch niedrigere Homologie der dazugehörigen Gene und Genabschnitte beweist, dass die Laccasen von *H. acidophila* evolutiv von anderen bekannten Laccasen entfernt sind. Während basidiomycetische Laccasen Homologien von 98 % Identität zueinander aufweisen können (Berka *et al.*, 1997), sind die höchsten Identitätswerte für die Laccasen aus *H. acidophila* 48 % (Lacc1), 46 % (Lacc2), 40 % (Lacc3) und 44 % (Lacc4). Für andere Ascomyceten liegen diese Werte in einem ähnlichen Bereich. So ist die Laccase aus *C. parasitica* zu 57 % und die von *P. anserina* zu 62 % identisch mit der Laccase von *N. crassa* und (Choi *et al.*, 1992; Fernandez-Larrea & Stahl, 1996). Die Laccasen aus *G. graminis* weisen Homologien von 38-42 % zu anderen Laccasen auf (Litvintseva & Henson, 2002). Betrachtet man nur die konservierten Kupferbindedomänen, so zeigt sich eine Konservierung aller für die Kupferbindung wichtigen Aminosäuren, doch unterscheiden sich die gesamten Kupferbindesequenzen der Laccasen aus *H. acidophila* untereinander stark (Abb. 63). Für jede Laccase gibt es jedoch Laccasen aus anderen Pilzen, die sehr ähnliche Kupferbindedomänen besitzen (Abb. 64).

Die Pilze, deren Laccasen die höchsten Homologien zu den Laccasen aus *H. acidophila* aufweisen, sind überwiegend pflanzenpathogen oder zumindest mit Pflanzen assoziiert. So ist z. B. *F. proliferatum* ein Weizenpathogen (Kwon & Anderson, 2002), *B. cinerea* infiziert Wein (Schouten *et al.*, 2002), *C. parasitica* ist der Erreger der Kastanienfäule (Choi *et al.*, 1992), *G. graminis* infiziert Wurzeln von Getreiden (Litvintseva & Henson, 2002), *C. lagenarium* verursacht Anthracnose der Gurkenpflanzen (Tsuji *et al.*, 2000) und *P. halima*, *P. spartinicola*, *B. spartinae* und *Stagonophora* spec. wurden von verwesenden Blättern von *Spartina alterniflora* (Lyons *et al.*, 2003) isoliert. Eine Verwandtschaft von *H. acidophila* zu pflanzenpathogenen Pilzen ist auch insofern möglich, als viele schwarze Hefen mit Pflanzen assoziiert leben (Eriksson, 1981), darunter der zu den Dothideales gehörende *Aureobasidium pullulans* (Yurlova *et al.*, 1999). Es muss jedoch in Erwägung gezogen werden, dass pflanzenpathogene Pilze auf Grund ihrer ökonomischen Relevanz besser erforscht und deshalb in den Datenbanken überrepräsentiert sind. Ob *H. acidophila* mit Pflanzen assoziiert wachsen kann, wurde bislang nicht untersucht.

Die erwähnten Pilze gehören zu folgenden Ordnungen: Diaporthales (*C. parasitica*), Helotiales (*B. cinerea*), Hypocreales (*F. proliferatum*, *Magnaportha grisea*), Phyllacorales (*C. lagenarium*) und vor allem Sordariales (*G. graminis*, *N. crassa*, *P. anserina*, *M. thermophilum*, *M. albomyces*, *C. thermophilum*). Weder ein Laccasegen noch eine Laccasesequenz sind für *M. grisea* beschrieben, doch ein hypothetisches Protein aus diesem Pilz weist eine sehr hohe Homologie zu den Laccasen von *H. acidophila* auf. Da eine Laccase aus *M. grisea* aufgereinigt wurde (Iyer & Chattoo, 2003), ist es gut möglich, dass es sich bei dem hypothetischen Protein um diese Laccase handelt. Der folgende Stammbaum (Abb. 70) zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse der Ordnungen untereinander.

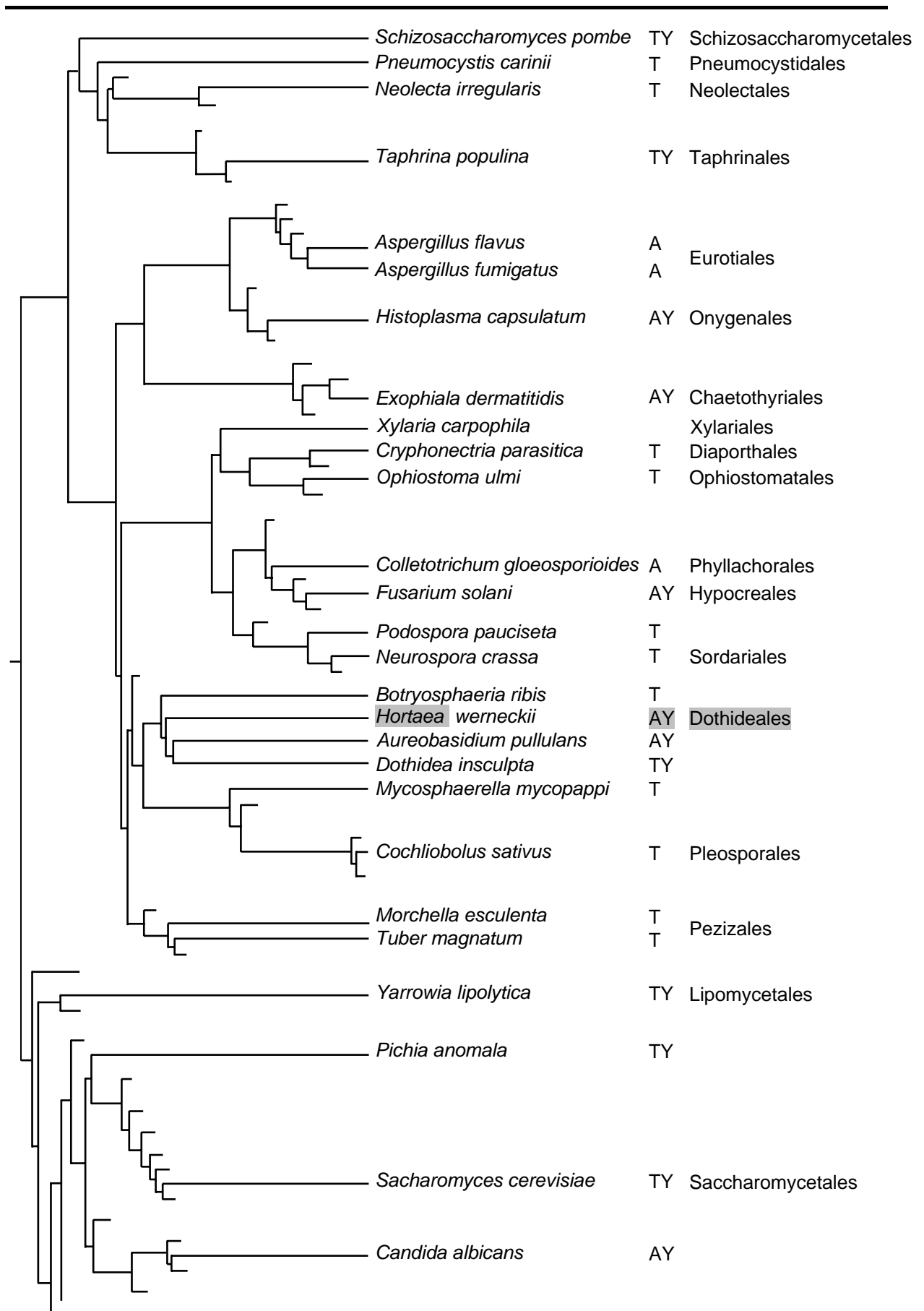


Abb. 70: Schematischer Stammbaum der Ascomyceten basierend auf der Primärstruktur des 18S rRNA Gen (verändert nach Prillinger *et al.*, 2002). T = teleomorphe Form, A = anamorphe Form, Y = Hefestadien.

Ein generelles Problem der Sequenzanalyse ist, dass sich nur Sequenzen vergleichen lassen, die in den Datenbanken vorhanden sind. Aus Vertretern der Ordnung Dothideales sind noch keine Laccasen beschrieben, auch wenn einige dieser Pilze bereits genetisch bearbeitet werden. Dies gilt z. B. für *Hortaea werneckii* (Petrovic *et al.*, 2002), *Exophiala dermatitidis* (Szaniszlo, 2002) und *Aureobasidium pullulans* (Yurlova *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2000). Zudem sind von einigen Pilzen mehrere Laccasen beschrieben und jede in der genutzten Datenbank vorhandene Sequenz wird in die Analyse einbezogen, so dass unter den Treffern viele Mehrfachnennungen sind. Ebenso befinden darunter viele hypothetische Proteine ohne Funktionszuweisung, die nicht berücksichtigt wurden, da nicht sicher gestellt ist, ob es sich überhaupt um Laccasen handelt. Außer Laccasen zeigte der Datenbankvergleich nur die Dihydrogeodinoxidase aus *Aspergillus terreus*, ebenfalls ein Kupferbindeprotein (Huang *et al.*, 1995), und das Fet3-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* an. Dieses Protein ist eine Ferroxidase, die auch mit dem Kupferstoffwechsel in Zusammenhang gebracht wird (Stoj & Kosman, 2003).

4.4.4 Anpassungen der Laccasen an niedrige pH-Werte

Proteine, die einer sauren Umgebung ausgesetzt sind, müssen an die dort herrschenden Bedingungen angepasst sein, da es sonst zu Stabilitätseinbußen kommt. Während Proteine mit anderen extremophilen Eigenschaften wie z. B. der Thermophilie bereits gut untersucht sind, ist über acidophile Proteine noch wenig bekannt (Schwermann *et al.*, 1994). Zudem stammen die veröffentlichten Daten in erster Linie von Prokaryonten. Da die Mikroorganismen den pH-Wert des Cytoplasmas in der Regel neutral halten, müssen nur Proteine, die direkt mit dem Außenmedium in Kontakt kommen, an die sauren Bedingungen angepasst sein.

Bereits 1979 wurde eine Studie über acidophile Membranproteine aus dem Bakterium *Thermoplasma acidophilum* veröffentlicht (Yang & Haug, 1979). Die Proteine wiesen mit 62 % eine große Anzahl an hydrophoben Aminosäuren auf, welche durch Bildung hydrophober Interaktionen zur Stabilisierung der Proteine beitragen können. Geladene Aminosäuren waren insgesamt selten, und die sauren Reste überwogen die basischen mit bis zu 9 % Überschuss. Insgesamt lagen höchstens 28 % geladene Gruppen vor, die jedoch bei niedrigem pH-Wert durch Protonierung weiter reduziert wurden. Diese deutliche Reduktion vor allem der positiven Ladungen verhindert eine Destabilisierung der Proteine auf Grund von elektrostatischer Abstoßung bei hoher Protonenstärke. Eine weitere Stabilisierung kommt durch neutrale und anionische Kohlenhydrate zustande, die Komplexe miteinander bilden können (Yang & Haug, 1979). Die Zuckerreste der N-Glykosylierungen von Laccasen erhöhen die negative Ladung

der Enzymoberfläche (Perry *et al.*, 1993) und sollten somit ebenfalls in der Lage sein, solche Komplexe zu bilden und die Enzyme zu stabilisieren. Da *T. thermophilum* auch thermophil ist, können sich allerdings verschiedene Anpassungsmechanismen überlagern. So ist z. B. die Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen bei thermophilen Proteinen bekannt (Yang & Haug, 1979).

Ebenfalls untersucht ist eine acidophile Amylase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Schwermann *et al.*, 1994). Auch dieses Gram-positive Bakterium ist thermophil. Die Amylase liegt im Unterschied zu den Membranproteinen aus *T. acidophilum* frei löslich im extrazellulären Raum vor, wodurch die geringere Hydrophobizität der acidophilen Amylasen erklärt werden kann. Für Membranproteine wie die bei *T. thermophilum* untersuchten, ist eine hohe Hydrophobizität zu erwarten, während ein lösliches Protein eher hydrophile Reste aufweisen sollte. Im Vergleich zu nicht-acidophilen Amylasen wurde keine Erhöhung der Hydrophobizität festgestellt. Die Amylase enthält 30 % weniger geladene Aminosäurereste, dafür aber mehr ungeladene polare Reste. Im Vergleich zu anderen Amylasen erfolgten diese Austausche vor allen auf der Oberfläche des Enzyms. Auf diese Weise wird die Dichte von positiven und negativen Ladungen herabgesetzt, was eine Abstoßung positiv geladener Gruppen bei niedrigem pH verhindert. Negativ geladene Gruppen werden zudem bei niedrigem pH-Wert protoniert, wodurch sich die Ladungsverteilung des Proteins verändert und stabilisierende Strukturen wie Wasserstoffbrückenbindungen zerstört werden können. Bei pH-Werten über dem pI des Proteins kann es zu einer Destabilisierung durch deprotonierte Säuregruppen kommen, die sich auf Grund ihrer negativen Ladung wiederum gegenseitig abstoßen. Dies wird durch Herabsetzung der Ladungen ebenfalls verhindert.

Auch bei *Sulfolobus acidocaldarius*, einem acidophilen Archaeobakterium, wurden in einem S-Layer-Protein auf der Zelloberfläche nur 2,6 % und in einer extrazellulären Aspartatprotease nur 6 % geladene Aminosäuren gefunden (Schwermann *et al.*, 1994). Beide Proteine enthalten dafür auffallend viele ungeladene polare Aminosäuren wie Serin und Threonin und kleine apolare Aminosäuren wie Alanin, Glycin und Prolin. Noch ist nicht geklärt, ob wenige Austausche zur Erhöhung der Acidostabilität ausreichen wie es bei der Thermophilie der Fall ist (Schwermann *et al.*, 1994). Ein weiteres extrazelluläres Enzym aus *A. acidocaldarius*, ein Endoglucanase, weist ebenfalls weniger geladene und dafür mehr ungeladene polare und apolare Aminosäuren auf (Eckert & Schneider, 2003). Vor allem der Gehalt an Lysin und Arginin ist um 6-10 % reduziert. Bei einer Cellulase aus dem gleichen Organismus konnten in der Primärstruktur keine Aminosäuren gefunden werden, die nachweislich für die Stabilität bei niedrigen pH-Werten verantwortlich sind (Huang *et al.*, 2005). Betrachtet man dagegen das

gefaltete Enzym, so fällt eine deutlich negative Oberflächenladung auf. Auch halophile Proteine weisen bei hoher Ionenstärke eine negative Oberflächenladung auf (Eisenberg & Wachtel, 1987). Dieser Überschuss von negativen Ladungen an der Zelloberfläche findet sich auch bei der Xylanase C aus *Aspergillus kawachii* (Fushinobu *et al.*, 1998), und kommt vor allem durch die Anwesenheit von Glutamat und Aspartat zustande. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen Aminosäuren scheinen dort für zusätzliche Stabilität zu sorgen, doch machen sie das Protein gleichzeitig anfälliger für Protonierung. Von der Primärsequenz ist diese Ladungsverteilung schwer abzuleiten, da die entsprechenden Aminosäuren nur in bestimmten nicht konservierten Bereichen vorkommen. Das Protein weist zudem einen sehr niedrigen pI auf, was bei den Laccasen von *H. acidophila* ebenfalls der Fall ist (Bend, 2005). Bei *Acetobacter aceti* wurden in der Ribonucleotidmutase vermehrt Salzbrücken nachgewiesen, an deren Bildung Arginin beteiligt ist (Settembre *et al.*, 2004). Die bekannten Mechanismen der Acidostabilität können folgendermaßen zusammengefasst werden:

1. Mehr hydrophobe Aminosäuren führen zu mehr hydrophoben Wechselwirkungen.
2. Durch weniger geladene Aminosäuren wird sowohl die Destabilisierung durch positive Ladungen bei hoher Protonendichte als auch durch negative Ladungen bei pH-Werten oberhalb des pI des Protein verhindert. Durch weniger negativ geladene Aminosäuren wird zudem die Zerstörung von Wasserstoffbrücken durch Protonierung von Säuregruppen vermieden.
3. Durch starke Reduktion von Lysin- und Argininresten kommt es zu einer negativen Oberflächenladung. Die negativ geladenen Aminosäuren können verstärkt zur Bildung von Wasserstoffbrücken dienen.
4. Anionische Kohlenhydrate stabilisieren das Protein durch Komplexbildung.
5. Bildung von Salzbrücken zwischen einzelnen Argininresten kann zu einer zusätzlichen Stabilisierung führen.

Die Proteine Lacc1 und Lacc2 und die Proteinfragmente von Lacc3 und Lacc4 sind auf ihre Aminosäurezusammensetzung hin untersucht worden, um zu überprüfen, ob eine Anpassung an saure Umweltbedingungen aus ihrer Primärstruktur abzulesen ist. Den größten Anteil an der Zusammensetzung machen bei allen Proteinen die kleinen aliphatischen, d. h. apolaren Aminosäuren aus. Lacc1 und Lacc2 sind mit um 58 % hydrophoben Aminosäuren zwar hydrophober als der Durchschnitt der zum Vergleich herangezogenen nicht-acidophilen Laccasen mit 55,8 % hydrophoben Aminosäuren, doch sind bei diesen Laccasen die Schwankungen sehr hoch. Im Vergleich zu den Proteinen aus *T. thermophilum* ist die Hydrophobizität von Lacc1 und Lacc2

jedoch nicht deutlich niedriger, obwohl es sich bei diesen nicht um Membranproteine handelt. Eine Stabilisierung durch starke hydrophobe Wechselwirkung könnte somit für viele Laccasen eine Rolle spielen, da diese durch ihre extrazelluläre Lokalisation häufig mit ungünstigen Umweltbedingungen konfrontiert werden.

Saure und basische Aminosäuren halten sich bei Lacc1 bis Lacc4 mit maximal 3 % Unterschied ungefähr die Waage (Abb. 61). Betrachtet man die Menge der geladenen Aminosäuren bei Lacc1 und Lacc2 im Vergleich zu anderen Laccasen, so stellt man fest, dass sowohl diese Werte als auch die für die Menge an Lysin und Arginin niedriger liegen als der Mittelwert der nicht-acidophilen Laccasen. Die Reduktion des Lysin- und Argininanteils ist bei Lacc2 deutlich höher als 10 % wie für *A. acidocaldarius* beschrieben. Für Lacc1 gilt dies für den Lysinanteil. Die Werte für Lacc3 und Lacc4 sind auf Grund der unvollständigen Sequenz weniger aussagekräftig, doch ist bei beiden Fragmenten zumindest die Lysingehalt ebenfalls stark herabgesetzt. Ein direkter Vergleich mit der Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Proteine von *T. thermophilum* zeigt, dass vor allem der Gehalt an Lysin und Arginin bei *H. acidophila* noch weiter herabgesetzt ist, während sich die Aminosäurezusammensetzung ansonsten ähnelt.

Diese Daten deuten auf eine Anpassung der Laccasen von *H. acidophila* an saure Umweltbedingungen hin. Die Menge an geladenen Aminosäuren ist insgesamt herabgesetzt, wobei dieser Effekt vor allem auf der Verringerung der positiven Ladungen beruht. Die Tatsache, dass die Laccasen über einen weiten pH-Bereich stabil sind (Bend, 2005), lässt sich durch die geringe Anzahl an geladenen Aminosäuren erklären. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass Austausch auf der Oberfläche der Proteine eine größere Wirkung haben als solche im Inneren des Proteins. Zurzeit können jedoch noch keine Aussagen über die räumliche Struktur der Laccasen aus *H. acidophila* gemacht werden, wobei der niedrige pI der aus *H. acidophila* isolierten Laccasen (Bend, 2005) allerdings für eine negative Oberflächenladung spricht. Zusätzlich werden die Laccasen durch die negativ geladenen Kohlenhydrate auf der Proteinoberfläche stabilisiert.

Die relativ hohe Hydrophobizität dieser Proteine kann ebenfalls zu einer Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen führen. Zwar zeigen sich die Proteine im Hydrophobizitätsprofil eher hydrophil, doch sind diese Hydrophobizitätswerte auf Grund der zu ihrer Ermittlung verwendeten Methode nicht unbedingt mit den errechneten prozentualen Anteilen der hydrophoben Aminosäuren an der Proteinzusammensetzung zu vergleichen. Um Letztere zu errechnen, musste definiert werden, welche Aminosäuren als hydrophob klassifiziert werden. Dazu wurde die Definition von Haug & Yang (1979) übernommen, um die Werte untereinander

vergleichbar zu machen, doch gibt es durchaus andere Definitionen. So werden niedrigere Werte ermittelt, wenn z. B. die Aminosäure Glycin nicht als hydrophob gewertet wird.

Wenn man davon ausgeht, dass Lacc1 ein extrazelluläres, Lacc2 hingegen ein cytoplasmatisches Protein darstellt, ist zu erwarten, dass sich beide Proteine in ihrer Aminosäurezusammensetzung voneinander unterscheiden. Dies ist jedoch nicht der Fall. Trotz geringer Sequenzidentität der vier Laccasen untereinander weisen sowohl die Hydrophobizitätsprofile als auch die Aminosäurezusammensetzung der Proteine eine große Ähnlichkeit zueinander auf. Die Abweichungen bei Lacc4 kommen sicherlich dadurch zustande, dass von diesem Protein nur eine kleine Teilsequenz zur Verfügung steht. Nur die geringere Anzahl an N-Glykosylierungsstellen von Lacc2 und das Fehlen der N-terminalen Signalsequenz stützt die These, dass es sich bei Lacc2 um ein cytoplasmatisches Protein handelt. Da die durch SecretomeP ermittelten Daten allerdings darauf hinweisen, dass das Protein Lacc2 Strukturmerkmale eines extrazellulären Proteins besitzt, wird die Theorie der Lokalisation in cytoplasmatischen Vesikeln und der Transport mit diesen Vesikeln aus der Zelle heraus weiter gestützt. Dass diese Vesikel mit dem sekretorischen Signalweg des Endoplasmatischen Retikulums zusammenhängen, ist auf Grund der fehlenden Signalsequenz von Lacc2 unwahrscheinlich. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es sich um melanosomenähnliche Vesikel handelt, in denen möglicherweise sogar ein saurer pH-Wert vorherrscht, was das außergewöhnlich niedrige pH-Optimum der intrazellulären Laccase erklären würde (Bend, 2005). Über die Lokalisation von Melanin in Vesikeln ist bisher kaum etwas bekannt, obwohl Melanosomen in Ascomyceten beschrieben sind (Sanchez-Mirt *et al.*, 1997). Einige Autoren vermuten, dass das Melanin cytoplasmatischen Vesikeln aufgelagert sei (San-Blas *et al.*, 1996), andere vermuten es dagegen in Vesikeln in der Nähe des Endoplasmatischen Retikulums und der Cytoplasmamembran (Sanchez-Mirt *et al.*, 1997).

4.5 Potenzieller Nutzen der Laccasen

Extremophile Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei industriellen Prozessen (Sharp & Munster, 1986). Während thermophile Laccasen z. B. aus *Chaetomium thermophilum* und *Melanocarpus albomyces* bereits untersucht wurden (Chefetz *et al.*, 1998; Kiiskinen *et al.*, 2002), sind Laccasen, die an extreme pH-Werte angepasst sind, bisher selten beschrieben. Zwei alkalophile Laccasen stammen aus *Bacillus halodurans* (Ruijsenaars & Hartmans, 2004) und *Myrothecium verrucaria* (Sulistyaningdyah *et al.*, 2004). Laccasen mit saurem pH-Optimum sind bisher nicht beschrieben, obwohl zumindest eine Laccase aus *Trametes multicolor* unter sauren Bedingungen zu arbeiten in der Lage ist (Leitner *et al.*, 2002). Hier

wurden neben ABTS auch phenolische Substrate untersucht, die noch bei pH 2 oxidiert wurden. Die Aktivität der meisten Laccasen gegenüber ABTS nimmt bei sinkendem pH-Wert zu, solange die Stabilität gewährleistet ist, da Anionen, die die Reaktion stören, bei niedrigem pH-Wert abnehmen (Ruijsenaars & Hartmans, 2004). Zumindest eine der Laccasen von *H. acidophila* scheint in der Lage zu sein, DMOP bei einem pH-Wert von 1,5 zu oxidieren (Bend, 2005). Ob die untersuchten Gene und hypothetischen Proteinsequenzen jedoch den an Hand ihrer oxidativen Wirkung nachgewiesenen Laccasen entsprechen, kann erst nach Aufreinigung der Proteine und anschließender Ansequenzierung geklärt werden. Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass noch weitere Laccasegene in *H. acidophila* existieren könnten. So sind in einigen Basidiomyceten inzwischen bis zu 8 Laccasegene beschrieben (Hoegger *et al.*, 2004).

Vor einem Einsatz der Laccasen in der Industrie muss das Redoxpotenzial untersucht werden, da es einen wesentlichen Einfluss darauf hat, welche Substrate spezifisch umgesetzt werden können (Xu, 1996). Es ist bereits nachweisbar, dass Lacc1 und Lacc2 zu den Klasse-2- und Klasse-3-Laccasen gehören und dadurch ein mittleres bis stark elektropositives Redoxpotenzial aufweisen. Weiterhin stellt sich die Frage nach den Einsatzorten der acidophilen Laccasen. In bekannten industriellen Prozessen wie der Papierbleiche werden meist alkalophile Laccasen benötigt (Ruijsenaars & Hartmans, 2004). Acidophile Laccasen könnten jedoch zur Detoxifizierung von Böden verwendet werden (Jovialt *et al.*, 2005), wenn diese gleichzeitig stark versauert sind. Ein besonders interessantes Gebiet ist die Modifikation von Naturstoffen mit Hilfe von Laccasen, woran auch saure Prozesse beteiligt sein können. Vor allem Polyphenole könnten so schonend modifiziert werden (Pilz *et al.*, 2003). Polyphenole, die natürlichen Substrate der Laccasen, sind wichtige Antioxidantien und weisen schützende Effekte gegen Krebs, koronare Herzerkrankungen und andere von oxidativem Stress herührende Erkrankungen auf (Tapiero *et al.*, 2002). Ascomycetische Laccasen mit ihren Polyphenol polymerisierenden Eigenschaften sollten für diese Aufgaben besser geeignet sein als die meisten basidiomycetischen Laccasen mit Lignin als natürlichem Substrat, die zudem meist Abbauschritte katalysieren (Gianfreda *et al.*, 1999; Bell & Wheeler, 1986).

4.6 Ausblick

Die vorgestellte Arbeit liefert wichtige Informationen über die Laccasegene von *H. acidophila*. Damit sind die Grundlagen geschaffen, um diese Gene heterolog zu exprimieren. An Hand der Präferenz der Codonverwendung und der wahrscheinlich starken

Glykosylierung der Laccasen lässt sich ableiten, dass die Expression in einem filamentösen Pilz wie *Aspergillus spec.* oder *Trichoderma spec.* am aussichtsreichsten wäre. Während Bakterien auf Grund ihrer Unfähigkeit zur korrekten Glykosylierung eukaryontischer Proteine und anderen Präferenzen der Codonverwendung für die heterologe Expression ungünstig erscheinen, führen *S. cerevisiae* und *P. pastoris* häufig eine Hyperglykosylierung der synthetisierten Proteine durch (Cassland & Jönsson, 1999; Otterbein *et al.*, 2000). Zudem ist auch bei diesen Organismen die Codonpräferenz deutlich anders als bei *H. acidophila*.

Vor der heterologen Expression muss festgelegt werden, welche der Laccasen die interessantesten Eigenschaften auf enzymatischer Ebene aufweist, und damit am geeignetsten für den Einsatz in der Industrie ist. Auf Grund der vorgestellten Daten muss davon ausgegangen werden, dass in *H. acidophila* mindestens vier verschiedene Laccasen existieren, die möglicherweise verschiedene Aufgaben erfüllen und eine unterschiedliche Lokalisation aufweisen, wie z. B. den extrazellulären Raum, die Zellwand und die cytoplasmatischen Melanosomen. Ist dieses Enzym ausgewählt, muss das dazugehörige Gen gefunden und für die Expression vorbereitet werden. Das kann geschehen, indem ein bekannter Teil der Proteinsequenz in DNA-Sequenz umgeschrieben und mit der DNA-Sequenz verglichen wird. Da noch nicht bekannt ist, ob die untersuchten Gene mit den in *H. acidophila* nachgewiesenen Laccasen übereinstimmen, und ebenfalls nicht auszuschließen ist, dass noch mehr als vier Laccasegene bei diesem Organismus vorhanden sind, wurde der Schwerpunkt in dieser Arbeit darauf gelegt, möglichst viele Informationen über möglichst viele der Laccasegene zu erhalten und Methoden zu etablieren, mit denen diese Gene aufgespürt und vollständig sequenziert werden können. Weiter bearbeitet werden sollte zukünftig das Gen, das das Enzym mit den interessantesten Eigenschaften kodiert.

Zwei der Laccasegene sind auf genomischer Ebene vollständig sequenziert, zwei andere teilweise. Zur heterologen Expression müssen die cDNA-Sequenzen der Laccasegene verwendet werden, da die Introns ansonsten den Leserahmen verändern würden. Da die Sequenzen von *lacc1* und *lacc2* bekannt sind, ist es möglich am 5'- und am 3'-Ende Primer abzuleiten, mit denen das vollständige Gen ausgehend von cDNA amplifiziert werden kann. Da das 5'-Ende von *lacc2* nicht sicher festgelegt werden konnte, kann alternativ auch ein Primer von dem weiter stromaufwärts gelegenen 5'-Ende abgeleitet werden. Von *lacc3* und *lacc4* müsste hierzu zuerst die vollständige Sequenz ermittelt werden, was jedoch mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten inversen PCR mit relativ geringem Aufwand möglich sein sollte. Um diese Versuche durchzuführen, muss eine Methode zur RNA-Extraktion für *H. acidophila* etabliert werden. Einzelne Methoden wurden in dieser Arbeit bereits ausprobiert und mögliche

Fehlerquellen diskutiert. Sobald cDNA zur Verfügung steht, können Induktions- und Expressionsversuche mit den verschiedenen Laccasegenen durchgeführt werden, um zu klären, ob sie unterschiedlich reguliert sind und ob die Transkription durch Kupfer oder andere Zusätze stimuliert werden kann. Für Expressionsstudien müssen zusätzlich Haushaltsgenprimer abgeleitet werden, was jedoch auf Grund der ermittelten Codonpräferenz von *H. acidophila* nun einfacher sein sollte als zu Beginn dieser Arbeit. Nachdem durch heterologe Expression ausreichend Laccase zur Verfügung steht, kann diese auf ihre Eignung für spezielle industrielle Prozesse hin untersucht und gegebenenfalls optimiert werden.

5 Zusammenfassung

Hortaea acidophila ist ein Ascomycet der Ordnung Dothideales und wird auf Grund seiner Fähigkeit zur Melaninbildung als schwarze Hefe bezeichnet. Diese Pilze wachsen häufig in Habitaten geringer Wasseraktivität wie auf Steinen oder Blattoberflächen und sind z. T. opportunistische Krankheitserreger. Interessantestes Merkmal von *H. acidophila* ist eine ausgeprägte Acidophilie, so dass der Pilz selbst bei einem pH-Wert von 0,6 noch wachsen kann. Wie viele Ascomyceten können schwarze Hefen DHN-Melanin bilden, an dessen Synthese u. a. Laccasen beteiligt sind. Diese Enzyme sind Polyphenoloxidasen und besitzen vier Kupferatome im katalytischen Zentrum. Die Laccase entzieht den Substraten ein Elektron, welches über die Kupferatome auf Sauerstoff übertragen wird, der nach Aufnahme von vier Elektronen zum H₂O reduziert wird. Laccasen werden industriell u. a. zur Papierbleiche, in der Textilindustrie und zur Modifikation von Naturstoffen genutzt. Da eine Laccase aus *H. acidophila* wahrscheinlich an saure Umweltbedingungen angepasst ist, lässt sich vermuten, dass sie interessante Eigenschaften für eine biotechnologische Nutzung besitzt. Dafür muss das für die Laccase kodierende Gen isoliert und heterolog exprimiert werden. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war daher, *Hortaea acidophila* für genetische Arbeiten zu erschließen und das oder die Laccasegene aufzuspüren.

Im Unterschied zu basidiomycetischen Laccasen sind ascomycetische Laccasen bisher nicht sehr gut untersucht, was z. T. damit zusammen hängt, dass letztere – abgesehen von den Kupferbinderegionen – meist nur schwach konserviert sind. Zudem sind schwarze Hefen genetisch insgesamt wenig erforscht, so dass die meisten Methoden für *H. acidophila* in dieser Arbeit neu etabliert werden mussten.

In einem ersten Schritt wurde auf enzymatischer Ebene nachgewiesen, dass *H. acidophila* Oxidasen besitzt, die sowohl mit den Zellen assoziiert bleiben als auch ins Medium sezerniert werden. Zumindest die sezernierte Oxidase ist kupferabhängig und kann kein Tyrosin oxidieren, was sie als Laccase auszeichnet. Schließlich konnten Laccasen sowohl im Kulturüberstand als auch im Zellextrakt über spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Eine kompetitive Hemmung durch Zugabe von Ascorbinsäure zeigte eine Beteiligung der Enzyme an der Melaninsynthese.

Nachdem nun die Existenz von Laccasen in *H. acidophila* bekannt war, wurden die Laccasegene ausgehend von genomischer DNA über Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Hierzu dienten Primer, die an Hand der konservierten Kupferbindesequenzen anderer ascomycetischer Laccasen abgeleitet worden waren. Die vier daraufhin amplifizierten Fragmente wiesen auf Aminosäureebene deutliche Homologien zu anderen ascomycetischen Laccasen

auf und wurden als Grundlage für die inverse PCR verwendet, mit der gezielt unbekannten Sequenzabschnitte amplifiziert werden können, die an bekannte Sequenzen angrenzen. Die Laccasegene *lacc1* und *lacc2* wurden so vollständig, *lacc3* und *lacc4* teilweise sequenziert. Alle Gene und Genabschnitte wurden in die Aminosäuresequenz übersetzt und konnten durch die Lage der konservierten Kupferbinderegionen und durch Sequenzvergleiche mit anderen Laccasen eindeutig als für Laccasen kodierend identifiziert werden. Bisher ist noch nicht bekannt, ob die untersuchten Gene mit den in *H. acidophila* nachgewiesenen Laccasen übereinstimmen und ob noch mehr als vier Laccasegene vorhanden sind. Deshalb erschien es sinnvoller, im weiteren Verlauf der Arbeit möglichst viele Informationen über die nachgewiesenen Laccasegene und ihre hypothetischen Genprodukte zu ermitteln als sich auf ein Gen zu konzentrieren.

Während das hypothetische Protein Lacc1 eine N-terminale Signalsequenz für den Proteinexport und mehrere N-Glykosylierungsstellen aufweist, besitzt Lacc2 keine Signalsequenz und ist deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit in melanosomenartigen Organellen im Cytoplasma lokalisiert. Dafür spricht auch die geringe Anzahl von nur zwei N-Glykosylierungsstellen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *H. acidophila* sind diese Melanosomen sichtbar, und auch bei anderen Vertretern der Ordnung Dothideales sind sie nachgewiesen. Während Lacc1-3 überwiegend zu ascomycetischen Laccasen homolog sind, zeigt der bekannte Abschnitt von Lacc4 mehr Ähnlichkeiten mit basidiomycetischen Laccasen. Die Homologien zu anderen Laccasen sind insgesamt mit maximal 48 % Identität relativ gering, doch sind die wichtigen Aminosäuren innerhalb der Kupferbinderegionen deutlich konserviert. Untereinander unterscheiden sich die Laccasen aus *H. acidophila* in ihrer Aminosäuresequenz ungewöhnlich stark. Lacc1 und Lacc2 weisen einige Merkmale von Proteinen auf, die an ein saures Milieu angepasst sind, darunter vor allem eine deutliche Herabsetzung der Anzahl geladener Aminosäuren. Da die Faltung dieser Laccasen nicht bekannt ist, können jedoch keine endgültigen Aussagen bezüglich der Anpassung an saure Bedingungen gemacht werden, bei der die Oberfläche der Proteine eine große Rolle spielt.

Mit diesen Ergebnissen sind die Grundlagen geschaffen, um die Laccasegene heterolog zu exprimieren. Nun muss die Laccase mit den interessantesten Eigenschaften für den Einsatz in der Industrie bestimmt und das dazugehörige Gen für die Expression vorbereitet werden.

6 Literatur

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts Keith, Watson JD** (1994) Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York & London
- Alves AMCR, Record E, Lomascolo A, Scholtmeijer K, Asther M, Wessels JGH, Wösten HAB** (2004) Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. Appl Environ Microbiol 70 (11): 6379-6384
- Alves Da Cunha MA, Barbosa AM, Giese EC, Dekker RFH** (2003) The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. J Basic Microbiol 43 (5): 385-392
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410
- Antorini M, Herpoel-Gimbert I, Choinowski T, Sigoillot JC, Asther M, Winterhalter K, Piontek K** (2002) Purification, crystallization and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. Biochim Biophys Acta 1594 (1): 109-114
- Aramayo R, Timberlake WE** (1990) Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* yA (laccase I) gene. Nucleic Acids Res 18 (11): 3415
- Arendse AS, Dubery IA, Berger DK** (1999) Isolation of PCR-based methods of a plant antifungal polygalacturonase-inhibiting protein gene. Electron J Biotechnol 3 (2): 152-159
- Asiegbu FO, Abu S, Stenlid J, Johansson M** (2004) Sequence polymorphism and molecular characterization of laccase genes of the conifer pathogen *Heterobasidium annosum*. Mycol Res 108 (2): 136-148
- Bao W, O'Malley R, Whetten R, Sederoff RR** (1993) A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. Science 260: 672-674
- Bell AA, Wheeler MH** (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. Ann Rev Phytopathol 24: 411-451
- Bend J** (2005) Extra- und intrazelluläre Laccasen der acidophilen schwarzen Hefe *Hortaea acidophila*. Dissertation, Universität Bonn (in Vorbereitung)
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S** (2004) Improved prediction of signal peptides – SignalP 3.0. J Mol Biol 340: 783-795
- Benoldi D, Alinovi A, Polonelli L, Conti S, Gerloni M, Ajello L, Padhye AA, de Hoog GS** (1991) *Botryomyces caespitosus* as an agent of cutaneous phaeohyphomycosis. J Med Vet Mycol 29: 9-13
- Berka RM, Schneider P, Golightly EJ, Brown SH, Madden M, Brown KM, Halkier T, Mondorf K, Xu F** (1997) Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. Appl Environ Microbiol 63 (8): 3151-3157

- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1522
- Bollag J-M, Shuttleworth KL, Anderson DH** (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl Environ Microbiol* 54 (12): 3068-3091
- Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M** (1995) Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol* 61 (5): 1876-1880
- Bourbonnais R, Leech D, Paice MG** (1998) Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochim Biophys Acta* 1379: 381-390
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 255-260
- Brakhage AA, Al-Abdallah Q, Tuncher A, Sprote P** (2005) Evolution of beta-lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry* 66 (11): 1200-1210
- Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C, Arnold FH** (2003) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl Environ Microbiol* 69 (2): 987-95
- Butin H, Pehl L, de Hoog GS, Wollenzien U** (1996) *Trimmatostroma abietis* sp. nov. (hyphomycete) and related species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 203-209
- Butler MJ, Day AW** (1998) Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol* 44: 1115-1136
- Caesar-Tonthat T-C, van Ommen Kloeke F, Geesey GG, Henson JM** (1995) Melanin production by a filamentous fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining. *Appl Environ Microbiol* 61 (5): 1968-1975
- Cai G, Salonikidis PS, Fei J, Schwarz W, Schulein R, Reutter W, Fan H** (2005) The role of N-glycosylation in the stability, trafficking and GABA-uptake of GABA-transporter 1. Terminal N-glycans facilitate efficient GABA-uptake activity of the GABA transporter. *FEBS J*: 272(7): 1625-38
- Cassland P, Jönsson LJ** (1999) Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 393-400
- Cha J-S and Cooksey DA** (1991) Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8915-8919
- Chefetz B, Chen Y, Hadar Y** (1998) Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl Environ Microbiol* 64 (9): 3175-3179

Chen S, Ge W, Buswell JA (2004) Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. FEMS Microbiol Lett 230: 171-176

Chenchik A, Diachenko L, Moqadam F, Tarabykin V, Lukyanov S, Siebert PD (1996) Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. BioTechniques 21: 526-534

Choi GH, Larson TG, Nuss DL (1992) Molecular analysis of the laccase gene from the chestnut blight fungus and selective suppression of its expression in an isogenic hypovirulent strain. Mol Plant Microbe Interact 5 (2): 119-128

Claus H (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. Arch Microbiol 179: 145-150

Colao MC, Garzillo A, Buonocore V, Schiesser A, Ruzzi M (2003) Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. Appl Microbiol Biotechnol 63: 153-158

Collins PJ, Dobson AD (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Appl Environ Microbiol 63: 3444-3450

Dedeyan B, Klonowska A, Tagger S, Tron T, Iacazio G, Gil G, Le Petit J (2000) Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. Appl Environ Microbiol 66 (3): 925-929

de Hoog GS (1993) Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. Antonie van Leeuwenhoek 63: 105-109

de Hoog GS, Gerrits van den Ende AHG (1992) Nutritional pattern and eco-physiology of *Hortaea werneckii*, agent of human tinea nigra. Antonie van Leeuwenhoek 62: 321-329

de Hoog GS, Zalar P, Urzì C, de Leo F, Yurlova NA, Sterflinger K (1999) Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. Stud Mycol 43: 31-37

de Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Attili Angelis D, Gerrits van den Ende AHG, Matos T, Peltroche-Llacsahuanga H, Pizzirani-Kleiner AA, Rainer J, Richard-Yegres N, Vicente V and Yegres F (2000) Black fungi: clinical and pathogenic approaches. Med Microbiol 38, Supplement I: 243-250

Deutsch, M and Long M (1999) Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. Nucleic Acids Res 27 (5): 3219-3228

Dohse J (2001) Charakterisierung einer sporenassoziierten Laccase bei den Ascomyceten *Trichoderma atroviride* und *Trichoderma harzianum*. Diplomarbeit, Universität Bonn

d'Souza TM, Boominathan K, Reddy CA (1996) Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. Appl Environ Microbiol 62 (10): 3739-3744.

- Ducros V, Davies GJ, Lawson DM, Wilson KS, Brown SH, Ostergaard P, Pedersen AH, Schneider P, Yaver DS, Brzozowski AM** (1997) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the laccase from *Coprinus cinereus*. *Acta Cryst. D53*: 605-607
- Eckert K, Schneider E** (2003) A thermoacidophilic endoglucanase (CelB) from *Alicyclobacillus acidocaldarius* displays high sequence similarity to arabinofuranosidases belonging to family 51 of glycoside hydrolases. *Eur J Biochem* 270: 3593-3602
- Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E** (2000) Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 271 (3): 726-30
- Edens WA, Goins TQ, Dooley D, Henson JM** (1999) Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Appl Environ Microbiol* 65 (7): 3071-3074
- Eggert C, Lafayette PR, Temp U, Eriksson K-E L, Dean JFD** (1998) Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol* 64 (5):1766-1772
- Eisenberg H, Wachtel EJ** (1987) Structural studies of halophilic proteins, ribosomes, and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annu Rev Biophys Chem* 16: 69-92
- Eriksson O** (1981) The families of bitunicate ascomycetes. *Opera Bot* 60: 1-209
- Faraco V, Giardina P, Sannia G** (2003) Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* 149: 2155-2162
- Fernandez E, Sanchez-Amat A, Solano F** (1999) Location and catalytic characteristics of a multipotent bacteria polyphenol oxidase. *Pigment Cell Res* 12 (5): 331-339
- Fernandez-Larrea J, Stahl U** (1996) Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet* 252: 539-551
- Fushinobu S, Ito K, Konno M, Wakagi T, Matsuzawa H** (1998) Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH. *Protein Eng* 11 (12): 1121-1128
- Gadd GM, de Rome L** (1988) Biosorption of copper by fungal melanins. *Appl Microbiol Biotechnol* 29: 610-617
- Gadd GM** (1993) Tansley Review No. 47, Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol* 124: 25-60
- Galhaup C, Haltrich D** (2001) Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 225-232
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK, Strauss J, Haltrich D** (2002) Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169

Garavaglia S, Cambria MT, Miglio M, Ragusa S, Iacobazzi V, Palmieri F, d'Ambrosio C, Scaloni A, Rizzi M (2004) The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J Mol Biol* 342: 1519-1531

Germann UA, Müller G, Hunziker PE, Lerch K (1988) Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Amino- and carboxylases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *J Biol Chem* 263 (2): 885-896

Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M (1999) Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem J* 3 (1): 1-25

Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G, Sannia G (1995) Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 61 (6): 2408-2413

Guarro J, Gené J, Stchigel AM (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 12 (3): 454-500

Hakulinen N, Kiiskinen L-L, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvinen J (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature structural biology* 8: 601-605

Hamaguchi K, Geiduschek EP (1962) The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix. *J Am Chem Soc* 84: 1329-1337

Hamilton AJ, Gómez BL (2002) Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol* 51: 189-191

Hatamoto O, Sekine H, Nakano E, Abe K (1999) Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. *Biosci Biotech Biochem* 63 (1): 58-64

Heiland, S (1999) Charakterisierung des Hexose-Transports in *Schizosaccharomyces pombe*. Dissertation, Universität Bonn

Henson JM, Butler MJ, Day AW (1999) The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 37: 447-471

Hoegger PJ, Navarro-González M, Kilaru S, Hoffmann M, Westbrook ED, Kües U (2004) The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Curr Genet* 45: 9-18

Hölker U, Fakoussa RM, Höfer M (1995) Growth substrates control the ability of *Fusarium oxysporum* to solubilize low-rank coal. *Appl Microbiol Biotechnol* 44: 351-355

Hölker U, Ludwig S, Scheel T, Höfer M (1999) Mechanisms of coal solubilization by the deuteromycetes *Trichoderma atroviride* and *Fusarium oxysporum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 57-60

Hölker U, Bend J, Pracht R, Tetsch L, Müller T, de Hoog GS (2004) *Hortaea acidophila*, a new acidophilic black yeast from lignite. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 287-294

- Hoffmann CS, Winston F** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267-272
- Horré R, de Hoog GS** (1999) Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Stud Mycol* 43: 176-193
- Horton P, Nakai K** (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 5: 147-52
- Horwitz JP, Chua J, Noel M, Donatti JT, Freisler J** (1966) Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J Med Chem* 9: 447
- Huang K, Fujii I, Ebizuka Y, Gomi K and Sankawa U** (1995) Molecular cloning and heterologous expression of the gene encoding dihydrogeodin oxidase, a multicopper blue enzyme from *Aspergillus terreus*. *J Biol Chem* 270 (37): 21495-21502
- Huang Y, Krauss G, Cottaz S, Driguez H, Lipps G** (2005) A highly acid-stable and thermostable endo-beta-glucanase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem J* 385 (Pt 2): 581-8
- Huber M, Lerch K** (1987) The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. *FEBS* 219 (2): 335-338
- Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- Iyer G, Chattoo BB** (2003) Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett* 227: 121-126
- Jacobson ES** (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 13 (4): 708-717
- Jana S, Deb JK** (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 289-298
- Jönsson LJ, Saloheimo M, Penttilä M** (1997) Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lccI* and expression in *Pichia pastoris*. *Curr Genet* 32: 425-430
- Jolivald C, Madzak C, Brault A, Caminade E, Malosse C, Mougin C** (2005) Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 450-456
- Junghanns C, Moeder M, Krauss G, Martin C, Schlosser D** (2005) Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151 (Pt 1): 45-57
- Karahanian E, Corsini G, Lobos S, Vicuna R** (1998) Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim Biophys Acta* 1443: 65-74.
- Kiiskinen L-L, Viikari L, Kruus K** (2002) Purification and characterization of a novel laccase from ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 198 – 204

- Kiiskinen L-L, Saloheimo M** (2004) Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. Appl Environ Microbiol 70 (1): 137-144
- Kiiskinen L-L, Kruus K, Bailey M, Ylösmäki E, Siika-aho M, Saloheimo M** (2004) Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. Microbiology 150: 3065-3074
- Knippers R** (1997) Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kogej T, Wheeler MH, Lanisnik Rizner T, Gunde-Cimerman N** (2004) Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. FEMS Microbiol Lett 232 (2): 203-209
- Kumar SVS, Phale PS, Durani S, Wangikar PP** (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. Biotechnol Bioeng 83 (4): 386-394
- Kwon S-L, Anderson A** (2002) Genes for multicopper proteins and laccase activity: common features in plant-associated *Fusarium* isolates. Can J Bot 80: 563-570
- Kyte J, Doolittle RF** (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J Mol Biol 157: 105-132
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA** (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genetics Biol 38: 143-158
- Larrondo LF, Salas L, Melo F, Vicuna R, Cullen D** (2003) A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. Appl Environ Microbiol 69 (10): 6257-6263
- Leitner C, Hess J, Galhaup C, Ludwig R, Nidetzky B, Kulbe KD, Haltrich D** (2002) Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolour*. Appl Biochem Biotechnol 98-100: 497-507
- Leonowicz A, Cho N-S, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenburg D, Rogalsko J** (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. J Basic Microbiol 41 (3-4): 185-227
- Lewin B** (1997) Genes VI. Oxford University Press, Oxford
- Lindequist U, Schauer F** (2002) Bioaktive Naturstoffe und neue Möglichkeiten zu ihrer Derivatisierung. BIOforum 4: 212-214
- Litvintseva AP, Henson JM** (2002) Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. Appl Environ Microbiol 68 (3): 1305-1311

- Lucas-Elío P, Solano F, Sanchez-Amat A** (2002) Regulation of polyphenol oxidase activities and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*: identification of *ppoS*, a gene encoding a sensor histidine kinase. *Microbiology* 148: 2457-2466
- Lyons JI, Newell SY, Buchan A, Moran MA** (2003) Diversity of ascomycete laccase gene sequences in a southeastern US salt marsh. *Microb Ecol* 45: 270-281
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J** (2000) Brock: Biology of Microorganisms. Prentice Hall International, Inc., London
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J** (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Mansur M, Suárez T, Fernández-Larrea JB, Brizuela MA and González AE** (1997) Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Appl Environ Microbiol* 63 (7): 2637-2646
- Mayer AM, Staples RC** (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565
- McIlvaine TC** (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* 49: 185-186
- Messerschmitt A, Huber R** (1990) The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationship. *Eur J Biochem* 187 (2): 342-352
- Michal G** (1983) In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer HU (ed) Vol. 1: 197
- Mikuni J, Morohoshi N** (1997) Cloning and sequencing of a second laccase from the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. *FEMS Microbiol Lett* 155: 79-84
- Miller JH** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Habor Laboratory, New York
- Mironov AA, Gelfand MS** (2004) Prediction and computer analysis of the exon-intron structure of human genes. *Mol Biol* 38 (1): 70-77
- Mullis KB, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* 155: 335-350
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ** (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl Environ Microbiol* 63 (6): 2166-2174
- Murphy RM, Watt KK, Cameron-Smith D, Gibbons CJ, Snow RJ** (2003) Effects of creatine supplementation on housekeeping genes in human skeletal muscle using real-time RT-PCR. *Physiol Genomics* 12 (2): 163-174
- Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, Kanda K, Sato T** (2003) Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiol* 149: 2455-2462

-
- Nita-Lazar M, Wacker M, Schegg B, Amber S, Aebi M** (2005) The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. *Glycobiology* 15 (4): 361-367
- Nitta K, Kataoka K, Sakurai T** (2002) Primary structure of a Japanese lacquer tree laccase as a prototype enzyme of multicopper oxidases. *J Inorg Biochem* 91: 125-131
- Nosanchuk D, Casadevall A** (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 5 (4): 203-223
- Ochman H, Gerber AS, Hartl DL** (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623
- Ong E, Pollock WBR, Smith M** (1997) Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. *Gene* 196: 113-119
- Otterbein L, Record E, Longhi S, Asther M, Moukha S** (2000) Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *FEBS* 267: 1619-1625
- Palmieri G, Bianco C, Cennamo G, Giardina P, Marino G, Monti M, Sannia G** (2001) Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 67 (6): 2754-2759
- Pearson WR, Lipman DJ** (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *PNAS* 85: 2444-2448
- Pegasova TV, Zwart P, Koroleva OV, Stepanova EV, Rebrikov DV, Lamzin VS** (2003) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a four-copper laccase from *Coriolus hirsutus*. *Acta Cryst D* 59: 1459-1461
- Perry CR, Smith M, Britnell CH, Wood DA, Thurston CF** (1993) Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol* 139 (Pt 6): 1209-1218
- Petrovic U, Gunde-Cimerman N, Plemenitas A** (2002) Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiol* 45 (3): 665-672
- Pilz R, Hammer E, Schauer F, Kragl U** (2003) Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 707-712
- Piontek K, Antorini M, Choinowski T** (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem* 277 (40): 37663-37669
- Pracht R** (2002) Physiologische Charakterisierung einer bisher unbeschriebenen pH-toleranten Schwarzen Hefe unter besonderer Berücksichtigung einer an der Melaninbildung beteiligten Laccase. Diplomarbeit, Universität Bonn

- Prillinger H, Lopandic K, Schweigkofler W, Deak R, Aarts HJM, Bauer R, Sterflinger K, Kraus GF, Maraz A** (2002) Phylogeny and systematics of the fungi with special reference to the ascomycota and basidiomycota. In: Fungal allergy and pathogenicity. Chem Immunol, Vol. 81 (Breitenbach M, Crameri R, Lehrer SB (eds): 207-295
- Qin H, Wu WB, Comeron JM, Kreitman M, Li W-H** (2004) Intragenic spatial patterns of codon usage bias in prokaryotic and eukaryotic genomes. Genetics 168: 2245-2260
- Raeder U, Broda P** (1988) Preparation and characterization of DNA from lignin degrading fungi. Method Enzymol 161: 211-220
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M, Boudet AM, Goffner D** (1999) Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family – in poplar. Eur J Biochem 259: 485-495
- Revankar SG, Patterson JE, Sutton DA, Pullen R, Rinaldi MG** (2002) Disseminated phaeohyphomycosis: review of an emerging mycosis. Clin Infec Dis 34: 467-476
- Rigling D, van Alfen NK** (1991) Regulation of laccase biosynthesis in the plant-pathogenic fungus *Cryphonectria parasitica* by double-stranded RNA. J Bacteriol 173 (24): 8000-8003
- Rose K, Liebergesell M, Steinbüchel A** (2000) Molecular analysis of the *Aureobasidium pullulans* *ura3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase and isolation of mutants defective in this gene. Appl Microbiol Biotechnol 53 (3): 296-300
- Rosenthal A, Jones DSC** (1990) Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res 18 (10): 3095-3096
- Ruel K, Burlat V, Comtat J, Moukha S, Sigoillot JC, Asther M, Joseleau JP** (1998) Visualization of the action of ligninolytic enzymes on high-yield pulp fibers. In: Enzyme applications in fiber processing. ACM Symposium Series 687, Eriksson K-E L and Cavaco-Paulo A (Editors)
- Ruijsenaars HJ, Hartmans S** (2004) A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. Appl Microbiol Biotechnol 65: 177-182
- Ruiz-Díez B** (2002) Strategies for the transformation of filamentous fungi. J Appl Microbiol 92(2): 189-95
- Saloheimo M, Niku-Paavola M-L, Knowles JKC** (1991) Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia radiata*. J Gen Microbiol 137: 1537-1544
- San-Blas G, Guanipa O, Moreno B, Pekerar S, San-Blas F** (1996) *Cladosporium carrionii* and *Hormoconis resinae* (*C. resinae*): Cell wall and melanin studies. Curr Microbiol 32: 11-16
- Sanchez-Mirt A, Romero H, Fernandez-Zeppenfeldt G** (1997) Growth and mycology of *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carrionii*. Mycol Med 7: 1-4

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Schäfer A, Specht M, Hetzheim A, Francke W, Schauer F** (2001) Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*. *Tetrahedron* 57: 7693-7699
- Schägger H, Jagov G** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379
- Scheel T, Hölker U, Ludwig S, Höfer M** (1999) Evidence for and expression of a laccase gene in three basidiomycetes degrading humic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 66-69
- Scherer M, Fischer R** (2001) Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* 199: 207-213
- Schlosser D, Grey R, Fritsche W** (1997) Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 412-418
- Schlosser I** (2000) Genetische Untersuchung der extrazellulären Enzyme der beiden kohlesolubilisierenden/-depolymerisierenden Deuteromyceten *Trichoderma atroviride* und *Fusarium oxysporum*. Diplomarbeit, Universität Bonn
- Schouten A, Wagemakers L, Stefanato FL, van der Kaaij RM, van Kan JAL** (2002) Resveratrol acts as a natural profungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Mol Microbiol* 43 (4): 883-894
- Schwermann B, Pfau K, Liliensiek B, Schleyer M, Fischer T and Bakker EP** (1994) Purification, properties and structural aspects of a thermoacidophilic α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* atcc 27009. Insight into acidostability of proteins. *Eur J Biochem* 226 (3): 981-991
- Settembre EC, Chittuluru JR, Mill CP, Kappock TJ, Ealick SE** (2004) Acidophilic adaptations in the structure of *Acetobacter aceti* N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase (PurE). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60 (Pt 10):1753-60
- Sharp RJ, Munster MJ** (1986) Biotechnological implications for microorganisms from extreme environments. In: *Microbes in extreme environments* (Herbert RA, Codd GA eds), Academic Press, London: 215-295
- Sigoillot C, Record E, Belle V, Robert JL, Levasseur A, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ, Fournel A, Sigoillot JC, Asther M** (2004) Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Appl Microbiol Biotechnol* 64 (3): 346-352
- Silver J, Keerikatte V** (1989) Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J Virol* 63 (7): 1924-1928
- Sinclair G, Choy FY** (2002) Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 26 (1): 96-105

Soden DM, Dobson ADW (2003) The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promotor sequences from the edible fungus *Pleurotus sajor-caju*. J Appl Microbiol 95: 553-562

Stoj C, Kosman DJ (2003) Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. FEBS Lett 554: 422-426

Stryer L (1995) Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York

Sulistyaningdyah WT, Ogawa J, Tanaka H, Maeda C, Shimizu S (2004) Characterization of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of *Myrothecium verrucaria* 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase. FEMS Microbiol Lett 230: 209-214

Szaniszlo P (2002) Molecular genetic studies of the model dermatiaceous pathogen *Wangiella dermatitidis*. Int J Med Microbiol 292: 381-390

Tanaka C, Tajima S, Furusawa I, Tsuda M (1992) The *Pgr1* mutant of *Cochliobolus heterostrophus* lacks a *p*-diphenol oxidase involved in naphthalenediol melanin synthesis. Mycol Res 96 (11): 959-964

Tapiero H, Tew KD, Nguyen Ba G, Mathé G (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? Biomed Pharmacother 56: 200-207

Temp U, Zierold U, Eggert C (1999). Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. Gene 236: 169-177

Tetsch L, Bend J, Janßen M, Hölker U (2005) Evidence for functional laccases in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* and isolation of laccase-specific gene fragments. FEMS Microbiol Lett 245 (1): 161-8

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25 (24): 4876-4882

Thurston CF (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140: 19-26

Tsuji G, Kenmochi Y, Takano Y, Sweigard J, Farrall L, Furusawa I, Horino O, Kubo Y (2000) Novel fungal transcriptional activators, Cmr1p of *Colletotrichum lagenarium* and Pig1p of *Magnaporthe grisea*, contain Cys2His2 zinc finger and Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA-binding motifs and regulate transcription of melanin biosynthesis genes in a developmentally specific manner. Mol Microbiol 38 (5): 940-954

Tsuji G, Fujikawa J, Ishida H, Horino O, Kubo Y (2001) Laccase gene *LAC1* of *Colletotrichum lagenarium* is not essential for melanin biosynthesis and pathogenicity. J Gen Plant Pathol 67: 182-190

Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci USA 76: 615-619

Wahleithner JA, Xu F, Brown KM, Brown SH, Golightly EJ, Halkier T, Kaupinnen S, Pederson A, Schneider P (1996) The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* 29: 395-403

Williamson PR (1994) Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* 176 (3): 656-664.

Xu F (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35 (23):7608-7614

Yang LL, Haug A (1979) Purification and partial characterization of a prokaryotic glycoprotein from the plasma membrane of *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim Biophys Acta* 556: 265-277

Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS, Varfolomeyev SD (1994) Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl Biochem Biotechnol* 49: 257-279

Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalboge H (1996) Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ Microbiol* 62 (3): 834-841

Yaver DS, Overjero MD, Xu F, Nelson BA, Brown KM, Halkier T, Bernauer S, Brown SH, Kauppinen S (1999) Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase Lcc1. *Appl Environ Microbiol* 65 (11): 4943 - 4948

Yoshida H (1883) Chemistry of Lacquer (Urushi). *J Chem Soc* 43: 472-486

Younchim S, Morris-Jones R, Hay RJ, Hamilton A (2004) Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 53: 175-181

Yurlova NA, de Hoog GS, Gerrits van den Ende AHG (1999) Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Stud Mycol* 43: 63-69

Zalar P, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N (1999) Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Stud Mycol* 43: 38-48

Zhao J, Kwan HS (1999) Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Appl Environ Microbiol* 65 (11): 4908-4913

Zhu X, Gibbons J, Garcia-Rivera J, Casadevall A, Williamson PR (2001) Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun* 69 (9): 5589-5596

7 Anhang

7.1 Abkürzungsliste

7.1.1 Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
act	Aktin
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillinresistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua demin.	demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cbs	copper binding site/sequence
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht (Niederlande)
cDNA	komplementäre DNA
CFU	colony forming unit
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
DAN	Diaminonaphthalen
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHN	Dihydroxynaphthalen
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMOP	Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease

dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg
EPK	Einzelprimerkontrolle
FASTA	FAST-ALL (fast protein or fast nucleotide comparison)
g	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GHB	γ -Glutaminy-4-hydroxybenzen
GPD	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hnRNA	heterogenous nuclear RNA
IgG-Fc	Fc-Fragment des Immunglobulin G
int	interne Sequenz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ITS	internal transcribed spacer
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<i>lacc1-4</i>	Laccasegene von <i>H. acidophila</i>
Lacc1-4	Genprodukte von <i>lacc1-4</i> , hypothetische Laccasen I-IV
<i>lacZ</i>	für die β -Galactosidase kodierendes Gen
M	Marker (Protein-, DNA-)
MCS	multiple cloning site
MRE	metal responsive element
mRNA	Boten-RNA
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda/MD (USA)
nm	Nanometer
OD ₍₆₀₀₎	optische Dichte (bei 600 nm)
Ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Kartoffel-Dextrose-Agar
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PGK	Phosphoglucokinase
% (v/v)	prozentualer Volumenanteil
% (w/v)	prozentualer Massenanteil pro Volumeneinheit
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RBS	Ribosomenbindestelle
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSU	small subunit (kleine Untereinheit der Ribosomen)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T _M	Schmelztemperatur
Temed	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TS	Teilsequenz
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
XGal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-(beta)-D-galactosid

7.1.2 Abkürzungen für PCR-Produkte und Restriktionsfragmente

PCR-Produkte

Prinzipiell wird jedes PCR-Produkt durch eine Kombination der zur Amplifikation verwendeten Primer bezeichnet. Beispiel: Primer cbs1 und cbs2 ergeben das PCR-Produkt cbs1/2.

Bei der inversen PCR wurden die Primer nach dem bekannten PCR-Produkt benannt, welches als Ausgangspunkt für die inverse PCR diente. Für das Fragment cbs2/int heißen die spezifischen Primer demnach inv2i. Die inversen Primer 5'-inv2i und 3'-inv2i ergeben das PCR-Produkt 2i-inv. Zusätzlich wird den PCR-Produkten der inversen PCR eine Abkürzung für das Restriktionsenzym vorgestellt, welches zur Vorbereitung der DNA-Matrize für die PCR verwendet wurde: B (*Bam*HI), E (*Eco*RI), A (*Avi*II), P (*Pvu*II) und Sm (*Sma*I) und Stu (*Stu*I). Daraus ergeben sich die folgenden Fragmentnamen:

B23-inv	inverses PCR-Produkt für <i>lacc1</i> (cbs 2/3),	Bam HI hydrolysiert
E23-inv	inverses PCR-Produkt für <i>lacc1</i> (cbs 2/3),	Eco RI hydrolysiert
Alacc1-inv	inverses PCR-Produkt für <i>lacc1</i> (inv lacc1),	Avi II hydrolysiert
Placc1-inv	inverses PCR-Produkt für <i>lacc1</i> (inv lacc1),	Pvu II hydrolysiert
B2i-inv	inverses PCR-Produkt für <i>lacc2</i> (cbs 2/int),	Bam HI hydrolysiert
E2i-inv	inverses PCR-Produkt für <i>lacc2</i> (cbs 2/int),	Eco RI hydrolysiert
A3i-inv	inverses PCR-Produkt für <i>lacc3</i> (int/cbs3),	Avi II hydrolysiert
Sm3i-inv	inverses PCR-Produkt für <i>lacc3</i> (int/cbs3),	Sma I hydrolysiert
Stu12-inv	inverses PCR-Produkt für <i>lacc4</i> (cbs 1/2),	Stu I hydrolysiert

Restriktionsfragmente

Die aus dem Gel eluierten Restriktionsfragmente tragen den Anfangsbuchstaben für das Enzym mit dem sie hydrolysiert wurden (B = *Bam*HI, E = *Eco*RI).

B2i	mit Bam HI hydrolysierte DNA, an die die Sonde cbs 2/int gebunden hat
E2i	mit Eco RI hydrolysierte DNA, an die die Sonde cbs 2/int gebunden hat
B23	mit Bam HI hydrolysierte DNA, and die die Sonde cbs 2/3 gebunden hat
E23	mit Eco RI hydrolysierte DNA, and die die Sonde cbs 2/3 gebunden hat

Durch Vorstellen eines „p“ wird das Plasmid bezeichnet, das das jeweilige PCR-Produkt oder Restriktionsfragment enthält. Beispiele: pcbs1/2, pB2i, pAlacc1-inv.

7.1.3 Abkürzungen für Sequenzen

DNA

A	Adenin	M	A oder C
C	Cytosin	N	G, A, T, oder C
G	Guanin	R	A oder G
T	Thymin	S	G oder C
B	G, T, oder C	V	G, A, oder C
D	G, A, oder T	W	A oder T
H	A, T, oder C	Y	C oder T
K	G oder T		

Protein

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

7.1.4 Nomenklatur der Laccasegene und Laccasen

Die isolierten Laccasegene werden mit *lacc1-4* bezeichnet. Die hypothetischen Genprodukte dieser Gene heißen folglich Lacc1-4. Dabei werden die Bezeichnungen *lacc3/lacc4* und Lacc3/Lacc4 zur Vereinfachung auch verwendet, wenn von den Fragmenten die Sprache ist. Die Laccasegene kodieren für die Laccasen I-IV. Da jedoch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurde, dass die Genprodukte der Gene *lacc1-4* funktionsfähige Laccasen sind, wird generell von Lacc1-4 statt von Laccase I-IV gesprochen.

7.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Erwin A. Galinski möchte ich recht herzlich für die Übernahme des Referats dieser Arbeit danken. Sein aufrichtiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit trotz des „exotischen“ Themas wusste ich immer zu schätzen.

Herrn Prof. Dr. Milan Höfer danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats und die hilfreichen Anmerkungen zu Veröffentlichungen und Tagungsbeiträgen.

Dr. Udo Hölker möchte ich ganz besonders danken für die Überlassung des interessanten Themas, Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Finanzierung und Betreuung dieser Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich Frau Dipl.-Biol. Jutta Bend, die mit mir so oft Freud und Leid experimentellen Arbeitens geteilt hat. Vielen Dank für Deine ständige Diskussionsbereitschaft, die hervorragende Zusammenarbeit, das Korrekturlesen dieser Arbeit, die Bereitstellung der Daten zum Substratspektrum unserer Laccase und nicht zuletzt Deine Freundschaft!

Herrn Prof. Volker Knoop danke ich für die Bereitstellung von Arbeitsgeräten (v. a. Hybridisierungsofen, UV-Crosslinker und Sequenzieranlage). Frau Dipl.-Chem. Monika Polsakiewicz und Frau Dipl.-Biol. Milena Groth-Malonek sei gedankt für ihre Diskussionsbereitschaft und die experimentelle Unterstützung im Zusammenhang mit DNA-Sequenzierungen.

Prof. Arnold Schwartz sei herzlich gedankt für die Bereitstellung von Materialien (allem voran das Super-GC-Polymerase-Enzymgemisch), die fachliche Unterstützung und die Bereitschaft, der Prüfungskommission beizutreten. Für letzteres gilt mein Dank auch Frau PD Gerhild van Echten-Deckert.

PD Dr. Jost Ludwig und PD Dr. Hella Lichtenberg-Fraté danke ich für die Möglichkeit zur Mitbenutzung von Geräten (z. B. Ribolyser).

Außerdem möchte ich allen Kollegen des IZMB und der Firma HöFer Bioreact GmbH danken, die mich während meiner Doktorarbeit fachlich unterstützt haben und die zu einer guten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Besonders nennen möchte ich hier zusätzlich zu

bereits genannten Personen Dr. Martina Janßen, Dipl.-Biol. Rolf Pracht, Dipl.-Biol. Sven Ludwig, Dipl.-Biol. Sarah Schwarzer, Dipl.-Biol. Petra Schwanewilm und Frau Bettina Kirberg.

Für die Bereitstellung von laccasespezifischen Antikörpern danke ich Dr. Hans-Peter Call und Dr. Markku Saloheimo (VTT Biotechnology, Espoo/Finnland). Dr. Magali Solé (Umweltforschungszentrum Halle-Leipzig) danke ich für die Gelegenheit, die Ergebnisse dieser Arbeit in Halle vorzustellen, und Dipl.-Biol. Harald Kellner (Universität Leipzig) gilt mein Dank für die Bereitstellung der basidiomycetischen Laccasegenprimer.

Meinen Eltern Jutta und Friedemann Tetsch danke ich dafür, dass sie an mich geglaubt haben und immer bereit waren, bei finanziellen Engpässen einzuspringen. Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinem Mann Dr. Pascal Eitner, der mich auf dem nicht immer leichten Weg begleitet hat. Vielen Dank für Deine Unterstützung beim Anfertigen von Computerabbildungen, Dein unermüdliches Korrekturlesen, fürs Zuhören und fürs Beschwichtigen meiner Zweifel! Wieder einmal gilt: Ohne Euch wäre diese Arbeit nie geschrieben worden!

Ein letzter Dank gilt meinem Goldhamster Hamlet, der mir beim Schreiben dieser Arbeit als einziger Gesellschaft geleistet hat, wenn auch meist schlafenderweise.

7.3 Lebenslauf

Name: Larissa Tetsch
Geburtsdatum: 11. Juni 1977
Geburtsort: Kiel
Familienstand: Verheiratet seit 2002

Schulbildung:

1983-1987 Evangelische Grundschule, Meckenheim
1987-1996 St.-Josef-Gymnasium, Rheinbach, Abschluss: Abitur

Studium:

09/96-10/01 Diplomstudiengang Biologie an der Universität Bonn
01/01-10/01 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Bonn zum Thema:
„Aufreinigung und Charakterisierung von TeaA, dem Substratbindeprotein des osmoregulierten Ectointransporters TeaABC“

Dissertation:

seit 11/02 Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik

Berufsbezogene

Tätigkeiten:

11/99-03/00 Studentische Hilfskraft mit Tutorentätigkeit
Zoologisches Institut, Universität Bonn
05/00-06/00 Industriepraktikum bei der BASF AG, Ludwigshafen,
Labor für Ökologie
01/02-03/02 Wissenschaftliche Hilfskraft mit Tutorentätigkeit
Institut für Mikrobiologie, Universität Bonn
06/02-08/02 Wissenschaftliche Hilfskraft mit Tutorentätigkeit
Institut für Zellbiologie, Universität Bonn
11/02-12/04 Wissenschaftliche Hilfskraft mit Tutorentätigkeit
Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik
04/05-09/05 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik

7.4 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

1. **Tetsch L, Kunte H-J** (2002) The substrate-binding protein TeaA of the osmoregulated ectoine transporter TeaABC from *Halomonas elongata*: Purification and characterization of recombinant TeaA. FEMS Microbiology Letters 211: 213-218
2. **Hölker U, Bend J, Pracht R, Tetsch L, Müller T, de Hoog GS** (2004) *Hortaea acidophila*, a new acidophilic black yeast from lignite. Antonie van Leeuwenhoek 86: 287-294
3. **Tetsch L, Bend J, Janßen M, Hölker U** (2005) Evidence for functional laccases in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* and isolation of laccase-specific gene fragments. FEMS Microbiol Lett 245 (1): 161-168
4. **Bend J, Tetsch L, Hölker U** (2005) Characteristics of an intracellular laccase from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. FEMS Microbiol Lett, in Vorbereitung
5. **Tetsch L, Bend J, Hölker U** (2005) Identification and molecular characterization of two laccase genes in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. Gene, in Vorbereitung

Tagungsbeiträge

1. **Tetsch L, Kunte H-J** (2001) Purification and characterization of the substrate-binding protein TeaA of the osmoregulated ectoine transport system TeaABC. VAAM Spätsommerschule, Oktober 2001
2. **Tetsch L, Kunte H-J** (2002) Sequence and functional analysis of TeaA, the periplasmic substrate-binding protein of the *Halomonas elongata* transport system TeaABC. VAAM Jahrestagung, März 2002
3. **Tetsch L, Bend J, Pracht R, Höfer M, Hölker U** (2003) Characterization of a laccase participating in the synthesis of melanin isolated from an acidophilic black yeast. VAAM Jahrestagung, März 2003
4. **Bend J, Tetsch L, Pracht R, Höfer M, Hölker U** (2003) Isolation and physiological characterization of the new, acidophilic black yeast dH 11932. VAAM Jahrestagung, März 2003
5. **Tetsch L, Janßen M, Hölker U** (2003) In search of the laccase genes of *Hortaea acidophila*. VAAM-Tagung „Molekularbiologie der Pilze“, September 2003
6. **Tetsch L, Janßen M, Hölker U** (2004) Detection of two laccase genes in the acidophilic, pigmented ascomycete *Hortaea acidophila*. VAAM Jahrestagung, März 2004
7. **Tetsch L, Janßen M, Hölker U** (2004) Strategies for the isolation of complete laccase genes from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. VAAM-Tagung “Stoffwechsel der Pilze”, September 2004

8. **Tetsch L, Hölker U** (2005) Laccases in *Hortaea acidophila*: is their acidophilic character reflected in their primary sequence? VAAM-Tagung “Molekularbiologie der Pilze”, September 2005

9. **Tetsch L, Hölker U** (2005) Molecular analysis of two complete and two partial laccase genes in *Hortaea acidophila*. VAAM-Jahrestagung, September 2005

Seminarvortrag

Laccasen und Laccasegene in dem Ascomyceten *Hortaea acidophila*, Umweltforschungszentrum Halle-Leipzig, August 2004

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und dabei ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Bonn, im Juli 2005